

Carlos Alberto Castillo Sarmiento

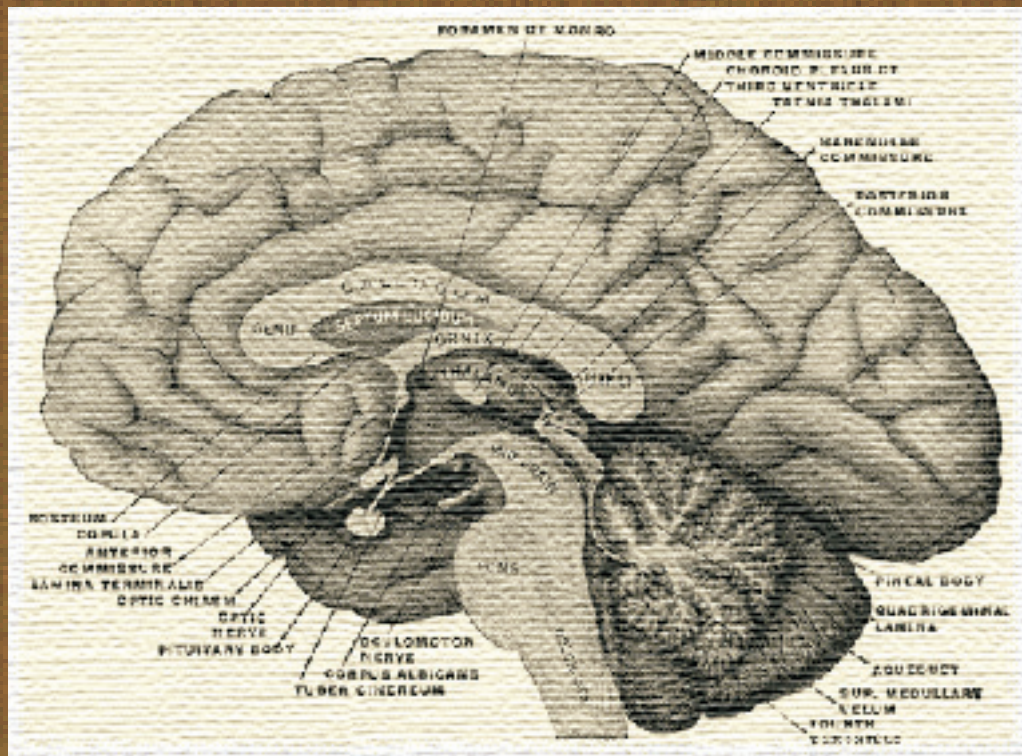
**MECANISMOS DE REGULACIÓN DE
LOS RECEPTORES DE ADENOSINA Y
METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO
EN CÉLULAS NEURONALES Y DE GLÍA.
IMPLICACIÓN EN PROCESOS DE
EXCITOTOXICIDAD Y MUERTE CELULAR**

I.S.B.N. Ediciones de la UCLM
978-84-8427-711-8



Ediciones de la Universidad
de Castilla-La Mancha

Cuenca, 2009



MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES
DE ADENOSINA Y METABOTRÓPICOS DE
GLUTAMATO EN CÉLULAS NEURONALES Y DE GLÍA.
IMPLICACIÓN EN PROCESOS DE
EXCITOTOXICIDAD Y MUERTE CELULAR.

CARLOS ALBERTO CASTILLO SARMIENTO



Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica

*Mecanismos de Regulación de los Receptores de Adenosina y
Metabotrópicos de Glutamato en Células Neuronales y de Glía.
Implicación en procesos de Excitotoxicidad y Muerte Celular.*

Carlos Alberto Castillo Sarmiento

Marzo 2009



Faculty of Chemistry

Department of Inorganic, Organic and Biochemistry

*Regulation of Adenosine Receptors and Metabotropic Glutamate
Receptors in Cortical Neurons and Glia.
Role in Excitotoxicity and Cellular Death.*

Carlos Alberto Castillo Sarmiento

March 2009

Dña. Mairena Martín López, Catedrática E. U. de Bioquímica y Biología Molecular de la Escuela Universitaria de Enfermería y **D. José Luis Albasanz Herrero**, Profesor Contratado Doctor de la Facultad de Ciencias Químicas, ambos profesores del Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica de la Universidad de Castilla la Mancha,

Certifican:

Que el trabajo de investigación titulado *“Mecanismos de Regulación de los Receptores de Adenosina y Metabotrópicos de Glutamato en Células Neuronales y de Glía. Implicación en procesos de Excitotoxicidad y Muerte Celular”* constituye la Memoria de D. Carlos Alberto Castillo Sarmiento, Licenciado en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, para optar al **grado de Doctor en Ciencias Químicas**.

Así mismo, certifican que este trabajo ha sido realizado bajo su tutela en el departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Castilla la Mancha, y que cumple todos los requisitos necesarios para su presentación.

Para que así conste, firman el presente certificado en Ciudad Real a 18 de Diciembre de 2008.



Fdo. Dra. Mairena Martín López



Fdo. Dr. José Luis Albasanz Herrero

Para Polo y Juan *In Memoriam*.

Después de engañar a Caronte con el cambio
se fueron a dar guerra al otro lado de la laguna Estigia.

“Una vez más, no queda sino batirse...”

Arturo Pérez-Reverte, *El Capitán Alatriste*.

El trabajo aquí expuesto ha sido realizado en su totalidad en el laboratorio “Dra.Cubero Llabrés”, del Área de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Castilla la Mancha, con ayuda de una beca predoctoral para la Formación de Personal Investigador otorgada por la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Comunidades de Castilla La Mancha.

Parte del trabajo recogido en la presente Memoria ha sido plasmado en las siguientes publicaciones científicas:

Castillo C. A., Albasanz J. L., Fernández M. y Martín M. (2007) Endogenous expression of adenosine A1, A2 and A3 receptors in rat C6 glioma cells. *Neurochem Res* **32**, 1056-1070.

Iglesias I., Castillo C. A., León D., Ruiz M. A., Albasanz J. L. y Martín M. (2007) Metabotropic glutamate receptor/phospholipase C system in female rat heart. *Brain Res* **1153**, 1-11.

León D., Castillo C. A., Ruiz M. A., Albasanz J. L. y Martín M. (2007) Metabotropic glutamate receptor/phospholipase C pathway is increased in rat brain at the end of pregnancy. *Neurochem Int* **50**, 681-688.

Castillo C. A., León D., Ruiz M. A., Albasanz J. L. y Martín M. (2008) Modulation of adenosine A(1) and A(2A) receptors in C6 glioma cells during hypoxia: involvement of endogenous adenosine. *J Neurochem*.

León D., Albasanz J. L., Castillo C. A. y Martín M. (2008a) Effect of glutamate intake during gestation on adenosine A(1) receptor/adenylyl cyclase pathway in both maternal and fetal rat brain. *J Neurochem* **104**, 435-445.

León D. A., Albasanz J. L., Castillo C. A., Iglesias I. y Martín M. (2008b) Effect of chronic gestational treatment with the adenosine A1 receptor agonist R-phenylisopropyladenosine on metabotropic glutamate receptors/phospholipase C pathway in maternal and fetal brain. *J Neurosci Res* **86**, 3295-3305.

Castillo C. A., Albasanz J. L., León D., Jordán J., Pallàs M., Camins A. y Martín M. (2009) Related expression of Adenosine Receptors in Brain from the Senescence Accelerated Mouse. *Exp Gerontol* (enviado).

Lorenzo A.M., León D., Castillo C. A., Ruiz M. A., Albasanz J. L. y Martín M. (2009) Maternal caffeine intake during gestation and lactation down-regulates adenosine A1 receptor in rat brain from mothers and neonates. *J Neurosci Res* (enviado).

Castillo C. A., León D., Ballesteros-Yáñez I., Iglesias I., Martín M y Albasanz J. L. (2009) Glutamate differently modulates metabotropic glutamate receptors natively expressed in neuronal and glial cells. *Eur J Neurosci* (enviado).

León D., Castillo C. A., Albasanz J. L. y Martín M. (2009) Down-regulation and desensitization of adenosine A1 receptor/adenylyl cyclase pathway after chronic R-PIA intake during pregnancy. *Neuroscience* (enviado).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	V
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	XIII
Resumen.....	XV
Abstract	XIX
Introducción	1
I.1. Receptores acoplados a proteínas G o de siete dominios transmembrana.	3
I.1.1. Estructura de los GPCRs.....	5
I.1.2. Clasificación de los GPCRs.....	6
I.1.3. La superfamilia de las GTPasas. Mecanismos de transducción de los GPCRs.....	7
I.1.4. Regulación de los GPCRs.....	11
I.2. El glutamato y sus receptores.....	13
I.2.1. Clasificación de los receptores metabotrópicos en función de su estructura, bioquímica y farmacología.	14
I.2.2. Papel fisiológico de los receptores metabotrópicos de glutamato.....	18
I.3. La adenosina en el Sistema Nervioso Central.....	20
I.3.1.Receptores de adenosina: clasificación, localización, rutas de señalización y funciones en el SNC....	22
I.3.2. Papel fisiológico de la adenosina: fenotipos de los ratones Knock-out.....	25
I.4. Neurodegeneración: Procesos de muerte neuronal.	27
I.4.1. Excitotoxicidad.....	28
I.4.2. Efecto de la disponibilidad biológica de oxígeno.....	30
I.4.3. El péptido amiloide y la enfermedad de Alzheimer.....	31
I.4.4. Efectos del estrés oxidativo.....	35
I.4.5. Envejecimiento y muerte celular.....	37
Objetivos	39
Materiales y Métodos	43
III.1. Materiales.....	45
III.2. Animales.....	45
III.3. Cultivo celular de la línea C6.....	46
III.4. Cultivos primarios de neuronas corticales de cerebro de rata.....	47
III.5. Aislamiento de membranas plasmáticas.....	48
III.6. Reacción en cadena de la Polimerasa clásica.....	50
III.7. Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa.....	50
III.8. Determinación de receptores metabotrópicos de glutamato mediante ensayos de unión de L-[³ H]Glutamato en células intactas.....	52

III.9. Determinación de los receptores de adenosina mediante ensayos de unión de [³ H]DPCPX o [³ H]ZM241385 en células intactas.	53
– Ensayos de unión de [³ H]DPCPX.	53
– Ensayos de unión de [³ H]ZM241385.	53
III.10. Determinación de los receptores de adenosina mediante ensayos de unión de [³ H]DPCPX o [³ H]ZM241385 en membranas plasmáticas.	54
– Ensayos de unión de [³ H]DPCPX.	54
– Ensayos de unión de [³ H]ZM241385.	54
III.11. Determinación de la actividad adenilato ciclasa.	54
III.12. Ensayo de viabilidad: test basado en MTT.	55
III.13. Ensayo de actividad caspasa 3.	56
III.14. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes: PAGE-SDS.	56
III.15. Inmovilización de proteínas: transferencia a membrana. Inmunodetección de proteínas.	56
III.16. Ensayos de inmunofluorescencia.	58
III.18. Evaluación de la morfología nuclear.	60
III.19. Determinación de la concentración de proteína.	60
III.20. Análisis de los parámetros cinéticos.	60
III.21. Análisis estadístico de los datos.	61
III.22. Dilución de los reactivos comerciales.	61
Resultados	63
IV.1 Expresión y caracterización de los receptores en células C6.	65
a) Receptores metabotrópicos de Glutamato.	65
b) Receptores de adenosina.	65
IV.2 Excitotoxicidad inducida por Glutamato.	73
IV.2.1 En cultivos primarios de neuronas de corteza.	73
a) Efecto en la viabilidad.	74
b) Receptores metabotrópicos de Glutamato.	75
c) Receptores de adenosina.	82
d) Tabla resumen.	89
IV.2.2 En células C6 de glioma de rata.	90
a) Viabilidad.	91
b) Receptores metabotrópicos de Glutamato.	92
c) Receptores de adenosina.	98
d) Tabla resumen.	103
IV.3 Efecto de la hipoxia sobre las células del SNC.	104
IV.3.1 En cultivos primarios de neuronas de corteza.	104
a) Viabilidad.	105
b) Receptores metabotrópicos de glutamato.	107

c)	Receptores de adenosina.....	117
d)	Tabla resumen.	128
IV.3.2	En células C6 de glioma de rata.	130
a)	Efecto en la viabilidad celular.	130
b)	Receptores metabotrópicos de Glutamato.	131
c)	Receptores de adenosina.....	136
d)	Tabla resumen.	146
IV.4	Muerte celular inducida por el péptido amiloide.....	147
IV.4.1	En cultivos primarios de neuronas de corteza.....	147
a)	Viabilidad.	147
b)	Receptores metabotrópicos de Glutamato.	150
c)	Receptores de adenosina.....	158
d)	Tabla resumen.	164
IV.4.2	En células C6 de glioma de rata.	165
a)	Efecto en la viabilidad.	165
b)	Receptores metabotrópicos de Glutamato.	169
c)	Receptores de adenosina.....	174
d)	Tabla resumen.	179
IV.5	Daño celular producido por estrés oxidativo: efecto del peróxido de hidrógeno.....	179
IV.5.1	En cultivos primarios de neuronas de corteza.....	179
a)	Efecto en la viabilidad celular.	180
b)	Receptores metabotrópicos de Glutamato.	181
c)	Receptores de adenosina.....	188
d)	Tabla resumen.	193
IV.5.2	En células C6 de glioma de rata.	193
a)	Efecto en la viabilidad celular.	194
b)	Receptores metabotrópicos de Glutamato.	195
c)	Receptores de adenosina.....	199
d)	Tabla resumen.	202
IV.6	Modulación de los receptores de adenosina en un modelo de envejecimiento acelerado.....	203
Discusión	209
V.1.	Expresión y caracterización de los receptores de adenosina en células C6.	211
V.2.	Excitotoxicidad inducida por Glutamato.	214
V.2.1	En cultivos primarios de neuronas de corteza.....	214
V.2.2	En células C6 de glioma de rata.	218
V.3.	Efecto de la hipoxia sobre las células de SNC.....	222
V.3.1	En cultivos primarios de neuronas de corteza.....	222
V.3.2	En células C6 de glioma de rata.	228

V.4. Muerte celular inducida por el péptido amiloide.	233
V.4.1 En cultivos primarios de neuronas de corteza.	233
V.4.2 En células C6 de glioma de rata.	238
V.5. Daño celular producido por estrés oxidativo: efecto del peróxido de hidrógeno.	242
V.5.1 En cultivos primarios de neuronas de corteza.	242
V.5.2 En células C6 de glioma de rata.	245
V.6. Modulación de los receptores de adenosina en un modelo de envejecimiento acelerado.	248
Conclusiones.	253
Bibliografía.	257
Nota del Autor.	277

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Representación esquemática de un GPCR.....	4
Ilustración 2: Modelo de activación de un GPCR.....	5
Ilustración 3: Aspectos estructurales más relevantes de las 3 principales familias de GPCRs.	7
Ilustración 4: El ciclo de las proteínas G.	9
Ilustración 5: Los GPCR están acoplados a la familia de las proteínas G.	10
Ilustración 6: Modelo clásico de internalización de los GPCR.	12
Ilustración 7: La fosforilación diferencial de los GPCR implica la activación de mecanismos efectores característicos.	13
Ilustración 8: Activación de los receptores mGlu del grupo I.....	16
Ilustración 9: Cascadas de señalización inducidas por la activación de los receptores mGlu.	17
Ilustración 10: Modos de activación de los receptores mGlu de los grupos II/III presinápticos.	20
Ilustración 11: Representación esquemática de las enzimas y transportadores que regulan los niveles de adenosina.	22
Ilustración 12: Comunicación neurona-glía mediada por los receptores A ₁ y A _{2A}	24
Ilustración 13: Rutas descritas de supervivencia y muerte celular.	28
Ilustración 14: Sucesos generales que ocurren en la muerte por excitotoxicidad.....	29
Ilustración 15: Varios sensores de oxígeno controlan la actividad de HIF-1 α	30
Ilustración 16: Procesamiento de la proteína APP y eventos claves en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.	34
Ilustración 17: Neurotoxicidad inducida por el péptido amiloide.	35
Ilustración 18: Generación anómala de ROS.	36
Ilustración 19: Ensayos de inmunofluorescencia en las células C6	47
Ilustración 20: Imágenes representativas en contraste de fases del desarrollo de un cultivo primario de neuronas de corteza de cerebro de rata.....	48
Ilustración 21: Imágenes representativas de experimentos de inmunofluorescencia a 16 DIV (I).	49
Ilustración 22: Imágenes representativas de experimentos de inmunofluorescencia a 16 DIV (II).	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de las rutas de transducción principales y farmacología de los mGluRs.	15
Tabla 2: Resumen del acoplamiento a proteínas G, farmacología y principales funciones fisiológicas de los receptores de adenosina.....	27
Tabla 3: Cebadores utilizados para la PCR en la amplificación de cada gen.	51
Tabla 4: Resumen de los anticuerpos primarios y secundarios así como de su procedencia y la dilución empleada para la inmunodetección de proteínas por la técnica de <i>Western blot</i>	57

Tabla 5: Resumen de los anticuerpos primarios y secundarios así como de su procedencia y la dilución empleada para la inmunodetección de proteínas.....	59
Tabla 6: Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos en neuronas corticales expuestas a L-Glu.....	77
Tabla 7: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de inmunofluorescencia en neuronas corticales expuestas a L-Glu.	79
Tabla 8: Resumen de los resultados obtenidos en neuronas corticales expuestas a L-Glu.....	90
Tabla 9: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en células C6 expuestas a L-Glu.....	93
Tabla 10: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de inmunofluorescencia en células C6 expuestas a L-Glu.....	95
Tabla 11: Resumen de los resultados obtenidos en células C6 expuestas a L-Glu.	104
Tabla 12: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en neuronas corticales expuestas a hipoxia moderda.	108
Tabla 13: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de inmunofluorescencia en neuronas corticales expuestas a hipoxia moderada.	110
Tabla 14: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en neuronas corticales expuestas a adenosina 1 μ M.....	114
Tabla 15: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en neuronas corticales expuestas a reoxigenación.	116
Tabla 16: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [3 H]DPCPX en neuronas corticales expuestas a hipoxia moderda.	118
Tabla 17: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [3 H]ZM241385 en neuronas corticales expuestas a hipoxia moderda.	119
Tabla 18: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [3 H]DPCPX en neuronas corticales expuestas a adenosina 1 μ M.....	124
Tabla 19: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [3 H]ZM241385 en neuronas corticales expuestas a adenosina 1 μ M.....	126
Tabla 20: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos para los receptores de adenosina en neuronas corticales expuestas a reoxigenación.	128
Tabla 21: Resumen de los resultados obtenidos en neuronas corticales expuestas a hipoxia.	129
Tabla 22: Resumen de los resultados obtenidos en neuronas corticales tratadas con adenosina.	130
Tabla 23: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en células C6 expuestas a hipoxia moderda.....	132
Tabla 24: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en células C6 expuestas a hipoxia moderda.....	135
Tabla 25: Resumen de los resultados obtenidos en células C6 expuestas a hipoxia moderada.	146
Tabla 26: Resumen de los resultados obtenidos en células C6 expuestas a hipoxia moderada.	147

Tabla 27: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35}	152
Tabla 28: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de inmunofluorescencia en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35}	155
Tabla 29: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [3H]DPCPX en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35}	159
Tabla 30: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [3H]ZM241385 en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35}	160
Tabla 31: Resumen de los resultados obtenidos en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35} 25 μM	164
Tabla 32: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de inmunofluorescencia en células C6 expuestas a βA_{25-35}	173
Tabla 33: Resumen de los resultados obtenidos en células C6 expuestas a βA_{25-35} 25 μM	179
Tabla 34: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en neuronas corticales expuestas a H_2O_2	182
Tabla 35: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de inmunofluorescencia en neuronas corticales expuestas a H_2O_2	184
Tabla 36: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [3H]DPCPX en neuronas corticales expuestas a H_2O_2	189
Tabla 37: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [3H]ZM241385 en neuronas corticales expuestas a H_2O_2	190
Tabla 38: Resumen de los resultados obtenidos en neuronas corticales expuestas a H_2O_2	193
Tabla 39: Resumen de los resultados obtenidos en células C6 expuestas a H_2O_2	203

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Detección de los receptores de Adenosina en células C6. Panel A.	66
Figura 2: Cuantificación por PCR a tiempo real de la expresión de receptores A1, A2A, A2B y A3.	67
Figura 3: Unión específica de [3H]DPCPX a membranas y a células intactas.....	68
Figura 4: Unión específica de [3H]ZM241385 a membranas y a células intactas.	68
Figura 5: Detección de las proteínas G_i en células C6.	69
Figura 6: Los receptores A_1 están acoplados a una proteína sensible a PTX.....	70
Figura 7: Actividad AC en células C6.....	71
Figura 8: Efecto de CGS 21680 en la actividad AC en células C6 intactas.	71
Figura 9: Efecto de NECA en la actividad AC en células C6 intactas.	72
Figura 10: Los receptores A_2 estimulan la actividad AC a través de una proteína αG_s	73
Figura 11: La exposición a L-Glu disminuye la viabilidad celular.	74
Figura 12: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión de caspasa 3.	75
Figura 13: La exposición a L-Glu modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular.....	76

Figura 14: La exposición a L-Glu modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular.	77
Figura 15: Inmunodetección de mGlu y PLC β_1 tras la exposición a L-Glu.....	78
Figura 16: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión génica de mGlu $_1$, mGlu $_5$ y PLC β_1	80
Figura 17: La exposición a L-Glu no varía la actividad PLC.....	81
Figura 18: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la actividad AC.....	82
Figura 19: La exposición a L-Glu regula al alza los receptores A $_1$ (I).	83
Figura 20: La exposición a L-Glu regula al alza los receptores A $_1$ (II).	83
Figura 21: La exposición a L-Glu regula al alza los receptores A $_1$ (III).	84
Figura 22: La exposición a L-Glu regula al alza los receptores A $_{2A}$	85
Figura 23: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión génica de A $_1$, A $_{2A}$ y A $_{2B}$	86
Figura 24: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la actividad AC.....	87
Figura 25: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión génica de los factores de transcripción CREB y CREM.	89
Figura 26: Las células C6 son resistentes a la exposición a L-Glu 100 μ M..	91
Figura 27: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión de caspasa 3.....	92
Figura 28: La exposición a L-Glu modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular de las células C6.	92
Figura 29: Inmunodetección de mGlu y PLC β_1	94
Figura 30: La exposición a L-Glu modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular.	94
Figura 31: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión génica de mGlu $_1$ y PLC β_1	96
Figura 32: La exposición a L-Glu no varía la actividad PLC.....	96
Figura 33: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la actividad AC.....	97
Figura 34: La exposición a L-Glu modula los receptores A $_1$ en la superficie celular de las células C6.	98
Figura 35: La exposición a L-Glu modula los receptores A $_{2A}$ en la superficie celular de las células C6.	99
Figura 36: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión génica de los receptores de adenosina.	101
Figura 37: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la actividad AC.....	102
Figura 38: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión génica de los factores CREB y CREM.....	103
Figura 39: Efecto de la hipoxia moderada sobre la expresión de caspasa 3.....	105
Figura 40: La exposición a hipoxia moderada disminuye la viabilidad celular.	106
Figura 41: La exposición a hipoxia moderada desencadena procesos apoptóticos.	107
Figura 42: La exposición a hipoxia moderada modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular..	108
Figura 43: Inmunodetección de mGlu y PLC β_1 tras la exposición a hipoxia moderada.....	109
Figura 44: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la expresión génica de mGlu $_1$, mGlu $_5$ y PLC β_1	111
Figura 45: La exposición a hipoxia moderada no afecta la actividad PLC basal.....	111
Figura 46: La exposición a 5% O $_2$ no afecta a la funcionalidad de los receptores metabotrópicos del grupo I. .	112
Figura 47: Efecto de la exposición a 5% O $_2$ sobre la actividad AC.	113
Figura 48: La exposición a adenosina modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular.....	114

Figura 49: Comparativa entre los parámetros cinéticos obtenidos en los experimentos de unión de radioligando al someter las neuronas corticales a 5% O ₂ o a adenosina 1 μM.....	115
Figura 50: La exposición a hipoxia produce efectos reversibles sobre los receptores metabotrópicos de glutamato.....	116
Figura 51: La exposición a hipoxia moderada modula los receptores A ₁ en la superficie celular.....	117
Figura 52: La exposición a hipoxia moderada modula los receptores A _{2A} en la superficie celular.....	119
Figura 53: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la expresión génica de A ₁ , A _{2A} y A _{2B}	120
Figura 54: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la expresión génica de los factores HIF-1α, HIF-3α, CREB y CREM.....	121
Figura 55: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la actividad AC.....	122
Figura 56: La exposición a adenosina modula los receptores A ₁ en la superficie celular.....	123
Figura 57: Comparativa entre los parámetros cinéticos obtenidos en los experimentos de unión de radioligando al someter las neuronas corticales a 5% O ₂ o bien a adenosina 1 μM.....	124
Figura 58: La exposición a adenosina modula los receptores A _{2A} en la superficie celular.....	125
Figura 59: Comparativa entre los parámetros cinéticos obtenidos en los experimentos de unión de radioligando al someter las neuronas corticales a 5% O ₂ o bien a adenosina 1 μM.....	126
Figura 60: La exposición a hipoxia produce efectos reversibles sobre los receptores A ₁ de adenosina.....	127
Figura 61: La exposición a hipoxia no produce efectos reversibles sobre los receptores A _{2A} de adenosina.....	128
Figura 62: Las células C6 resisten la bajada en la disponibilidad de oxígeno.....	131
Figura 63: La exposición a hipoxia moderada modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular.....	132
Figura 64: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la expresión génica de mGlu ₁ y PLCβ ₁	133
Figura 65: La exposición a hipoxia moderada no afecta la actividad PLC basal.....	133
Figura 66: La exposición a 5% O ₂ no afecta a la funcionalidad de los receptores metabotrópicos del grupo I.....	134
Figura 67: La exposición a adenosina modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular.....	135
Figura 68: Comparativa entre los parámetros cinéticos obtenidos en los experimentos de unión de radioligando al someter las células C6 a 5% O ₂ o bien a adenosina 1 μM.....	136
Figura 69: La exposición a hipoxia moderada modula los receptores A ₁ en la superficie celular.....	137
Figura 70: Efecto de la hipoxia moderada sobre la actividad AC basal y su inhibición mediada por el receptor A ₁	137
Figura 71: Movilización del calcio en células C6.....	139
Figura 72: La exposición a hipoxia moderada modula los receptores A _{2A} en la superficie celular.....	139
Figura 73: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la actividad AC estimulada por los receptores A ₂	140
Figura 74: La exposición a adenosina modula los receptores A ₁ en la superficie celular.....	141
Figura 75: La exposición a adenosina modula los receptores A _{2A} en la superficie celular.....	142
Figura 76: Efecto de la adenosina desaminasa durante la hipoxia.....	143
Figura 77: La modulación de los receptores de adenosina durante la hipoxia moderada se produce a través de la activación del receptor A ₁	144

Figura 78: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la expresión génica de los receptores de adenosina.	145
Figura 79: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la expresión génica de los factores HIF-1 α , HIF-3 α , CREB y CREM.	145
Figura 80: La exposición a βA_{25-35} disminuye la viabilidad celular de forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.	148
Figura 81: La exposición a βA_{1-42} disminuye la viabilidad celular de forma similar a la exposición a βA_{25-35}	149
Figura 82: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión de caspasa 3.	149
Figura 83: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la actividad de caspasa 3.	150
Figura 84: La exposición a βA_{25-35} modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular.	151
Figura 85: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión génica de mGlu ₁ , mGlu ₅ y PLC β_1	152
Figura 86: Inmunodetección de mGlu y PLC β_1 tras la exposición a βA_{25-35}	154
Figura 87: La exposición a βA_{25-35} no afecta la actividad PLC basal.	155
Figura 88: La exposición a βA_{25-35} afecta a la funcionalidad de los receptores metabotrópicos del grupo I.	156
Figura 89: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la actividad AC basal.	157
Figura 90: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la actividad AC mediada por los receptores mGlu.	158
Figura 91: La exposición a βA_{25-35} modula los receptores A ₁ en la superficie celular.	159
Figura 92: La exposición a βA_{25-35} modula los receptores A _{2A} en la superficie celular.	160
Figura 93: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión génica de A ₁ , A _{2A} y A _{2B}	161
Figura 94: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la actividad AC mediada por los receptores de adenosina. ..	162
Figura 95: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión génica de los factores CREB y CREM.	163
Figura 96: La exposición a βA_{25-35} disminuye la viabilidad celular (I).	166
Figura 97: La exposición a βA_{25-35} disminuye la viabilidad celular (II).	166
Figura 98: Resumen del efecto observado por exposición a βA_{25-35} en el tiempo.	167
Figura 99: La exposición a βA_{1-42} disminuye la viabilidad celular de forma similar a βA_{25-35}	167
Figura 100: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la actividad de caspasa 3.	168
Figura 101: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión de caspasa 3.	169
Figura 102: La exposición a βA_{25-35} modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular.	170
Figura 103: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión génica de mGlu ₁ y PLC β_1	171
Figura 104: Inmunodetección de mGlu ₁ , mGlu ₅ y mGlu _{2,3} tras la exposición a βA_{25-35} (I).	172
Figura 105: Inmunodetección de mGlu ₁ , mGlu ₅ y mGlu _{2,3} tras la exposición a βA_{25-35} (II).	173
Figura 106: Inmunodetección de PLC β_1 tras la exposición a βA_{25-35}	174
Figura 107: La exposición a βA_{25-35} modula los receptores A ₁ en la superficie celular.	175
Figura 108: La exposición a βA_{25-35} modula los receptores A _{2A} en la superficie celular.	176
Figura 109: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión génica de A ₁ , A _{2A} , A _{2B} y A ₃	177
Figura 110: El efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión génica de los factores CREB y CREM depende del tiempo de exposición.	178

Figura 111: La exposición a H ₂ O ₂ disminuye la viabilidad celular de forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.	180
Figura 112: Efecto de la exposición a H ₂ O ₂ sobre la expresión de caspasa 3.	181
Figura 113: La exposición a H ₂ O ₂ modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular.	182
Figura 114: Inmunodetección de mGlu ₁ , mGlu ₅ y mGlu _{2,3} tras la exposición a H ₂ O ₂	183
Figura 115: La exposición a H ₂ O ₂ no afecta la actividad PLC basal.	184
Figura 116: La exposición a H ₂ O ₂ afecta a la funcionalidad de los receptores metabotrópicos del grupo I.	185
Figura 117: Efecto de la exposición a H ₂ O ₂ sobre la expresión génica de mGlu ₁ , mGlu ₅ y PLCβ ₁	186
Figura 118: Efecto de la exposición a H ₂ O ₂ sobre la actividad AC basal.	187
Figura 119: Efecto de la exposición a H ₂ O ₂ sobre la actividad AC mediada por los receptores mGlu.	187
Figura 120: La exposición a H ₂ O ₂ modula los receptores A ₁ en la superficie celular.	188
Figura 121: La exposición a H ₂ O ₂ modula los receptores A _{2A} en la superficie celular.	189
Figura 122: Efecto de la exposición a H ₂ O ₂ sobre la expresión génica de A ₁ , A _{2A} y A _{2B}	191
Figura 123: Efecto de la exposición a H ₂ O ₂ sobre la actividad AC mediada por los receptores de adenosina....	192
Figura 124: Efecto de la exposición a H ₂ O ₂ sobre la expresión génica de los factores CREB y CREM.	192
Figura 125: La exposición a H ₂ O ₂ disminuye la viabilidad celular.	194
Figura 126: Efecto de la exposición a H ₂ O ₂ sobre la actividad de caspasa 3.	195
Figura 127: La exposición a H ₂ O ₂ regula de manera subtipo específica los receptores mGlu.	197
Figura 128: La exposición a H ₂ O ₂ regula al alza la proteína PLCβ ₁	198
Figura 129: Efecto de la exposición a H ₂ O ₂ sobre la expresión génica de mGlu ₁ y PLCβ ₁	198
Figura 130: La exposición a H ₂ O ₂ regula al alza los receptores de adenosina A ₁ y A _{2A}	200
Figura 131: La exposición a H ₂ O ₂ no modula la proteína AC I.	200
Figura 132: Efecto de la exposición a H ₂ O ₂ sobre la expresión génica de los receptores de adenosina.	201
Figura 133: Efecto de la exposición a H ₂ O ₂ sobre la expresión génica de los factores CREB y CREM.	202
Figura 134: Análisis de la expresión génica de los receptores de adenosina en un modelo de envejecimiento.	204
Figura 135: Detección de los receptores A ₁ en ratones SAM mediante unión de radioligandos.	205
Figura 136: Detección de los receptores A ₁ y A _{2A} en ratones SAM mediante <i>Western blot</i>	206
Figura 137: El envejecimiento disminuye los receptores A ₁ en cerebro de rata.	206
Figura 138: Efecto del envejecimiento sobre la actividad AC.	207

ABREVIATURAS

β A	Péptido β amiloide	CPA	N ⁶ -ciclopentiladenosina
[³ H]DPCPX	[propil- ³ H] 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina	CPCCOEt	Etil éster 7-(Hidroxiimino)ciclopropa[β]cromen-1 α -carboxilato
[³ H]ZM241385	2-[³ H]-4-(2-[7-amino-2-(2-furil){1,2,4}triazolo{2,3- α }{1,3,5,}triazin-5-il amino]etil)fenol	CPPG	(RS)- α -Ciclopropil-4-fosfonofenilglicina
2-Cl-IB-MECA	2-Cloro-N ⁶ -(3-iodobencil)-adenosina-5'-N-metiluronamida	Da	Daltons
ACPD	Ácido (1S,3R)-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxílico	DAG	Diacilglicerol
ADA	Adenosina desaminasa	DCG-IV	(2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-Dicarboxiciclopropil)glicina
ADN	Ácido desoxirribonucleico	DEPC	Dietilpirocarbonato
ADNasa	Desoxirribonucleasa	DHPG	(S)-3,5-Dihidroxifenilglicina
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia	DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
Ado	Adenosina	DMSO	Dimetilsulfóxido
ADP	Adenosina-5'-difosfato	dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
AIDA	Ácido (RS)-1-aminoindan-1,5-dicarboxílico	DPCPX	8-Cyclopentil-1,3-dipropilxantina
AMP	Adenosina- 5'-monofosfato	DTT	Ditiotreitol
AMPA	Ácido Amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4- propiónico	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
AMPc	Adenosina 3',5' monofosfato cíclico	EGLU	Ácido (2S)- α -Etilglutámico
APDC	(2R,4R)-4-Aminopirrolidinea-2,4-dicarboxilato	EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N, N, N', N'-tetraacético
APP	Proteína precursora de β amiloide	GABA	Ácido γ -aminobutírico
AraC	Cytosina β -D-arabinofuranósido	GDP	Guanosina-5'-difosfato
ARN	Ácido ribonucleico	GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
ARNasa	Ribonucleasa	Gpp(NH)p	Guanililimido difosfato.
ARNm	ARN mensajero	GRK	Quinasa acoplada a un GPCR
ATP	Adenosina 5'-trifosfato	GSH	Glutation
B _{max}	Unión máxima	GTP	Guanosina-5'-trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino	GTP- γ -S	Guanosina-5'-O-(3-tiotrifosfato)
CGS 21680	2-[p-(2-carboxietil)feniletilamino]-5'-N-etilcarboxamido adenosina	HE-NECA	2-Hexinil-5'-etilcarboxamidoadenosina
CHA	N ⁶ -ciclohexiladenosina	HIF	Factor inducible por hipoxia
CHPG	(RS)-2-Cloro-5-hidroxifenilglicina	iGlu	Receptores ionotrópicos de Glutamato

IP ₃	Inositol-1,4,5-trisfosfato	PKA	Proteína quinasa dependiente de
Kb	Kilobases		AMPC
K _D	Constante de disociación	PKC	Proteína quinasa dependiente de
kDa	Kilodaltons		calcio
KO	<i>Knock-out</i>	PLC	Fosfolipasa C
L-[³ H]Glu	Ácido L [3,4- ³ H]Glutámico	PLD	Fosfolipasa D
L-AP4	Ácido L-(+)-2-Amino-4-fosfonobutirico	PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
L-Glu	Ácido L-Glutámico	PSB 1115	Ácido 4-(2,3,6,7-Tetraidro-2,6-dioxo-1-propil-1H-purin-8-il)-bencenosulfonico
L-SOP	O-fosfo-L-serina		
LY341495	Ácido (2S)-2-Amino-2-[(1S,2S)-2-carboxicicloprop-1-il]-3-(xant-9-il)propanoico	PSMF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
LY367385	Ácido (S)-(+)-α-Amino-4-carboxi-2-metilbencenoacetico	PTX	Toxina pertúsica
MAP4	Ácido (S)-2-Amino-2-metil-4-fosfonobutanoico	Quis	Ácido L-Quiscuálico
MAP	Quinasas activadas por mitógenos	Ro 20-1724	4-(3-Butoxi-4-metoxibencil)imidazolidin-2-ona
MCCG	α-metil-ciclopropil glicina	ROS	Especies reactivas de oxígeno
MCPG	(RS)-α-Metil-3-carboxi-4-hidroxifenilglicina	R-PIA	(-)-N ⁶ -fenilisopropiladenosina
MEM	Medio mínimo esencial	RT-PCR	Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa
MeSOP	(R,S)-α-metilserina-O-fosfato	SAM	Ratones de senescencia acelerada
mGlu	Receptores metabotrópicos de Glutamato	SDS	Dodecil sulfato sódico
MPEP	Hidrocloreuro de 2-Metil-6-(feniletinil)piridina	SEM	Error estándar de la media
MRS 1220	N-[9-Cloro-2-(2-furanil)[1,2,4]-triazolo[1,5-γ]quinazolin-5-il]benceno acetamida	SNC	Sistema nervioso central
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio	Tris	Trishidroximetilaminometano
NB	Neurobasal	VSCC	Canales de calcio sensibles a voltaje
NECA	5-N-etilcarboxamidoadenosina	ZM241385	4-(2-[7-amino-2-{2-furil}{1,2,4}triazolo{2,3-α}{1,3,5,}triazin-5-il amino]etil)fenol
PBS	Tampón fosfato salino		
PFA	Paraformaldehído		
PIP ₂	Inositol-4,5-bisfosfato		

RESUMEN

Los receptores de adenosina (AR) y los metabotrópicos de glutamato (mGlu) están implicados en multitud de procesos fisiológicos en el organismo. En el Sistema Nervioso Central (SNC) la adenosina, mediante su acción neuromoduladora, controla la excitabilidad neuronal, ejerciendo su efecto a través de los receptores de alta afinidad A1 y A2A. Estos receptores interaccionan con receptores de neurotransmisores, de neuromoduladores y con sistemas de transporte de adenosina. Por otro lado, el glutamato, principal neurotransmisor excitador del SNC, está implicado en fenómenos fisiológicos, como la transmisión del impulso nervioso, y patológicos, como la muerte excitotóxica. El glutamato ejerce su acción a través de los receptores de glutamato, tanto ionotrópicos (canales iónicos) como metabotrópicos (GPCR). Se ha descrito la implicación de los AR y mGlu en procesos de neuroprotección/neurodegeneración en varios modelos, así como su modulación en algunas enfermedades neurodegenerativas, por lo que su estudio se reviste de especial interés hoy día. En esta memoria se han explorado los mecanismos de modulación de estos receptores en células neuronales y de glía expuestas a diferentes estímulos relacionados con procesos de neurodegeneración y muerte neuronal, como son la excitotoxicidad, la hipoxia, el péptido amiloide y el agua oxigenada. Por otro lado, se ha estudiado cómo se modulan en cerebro los AR durante el envejecimiento en el modelo murino de senescencia acelerada (SAM). Se han empleado distintos abordajes experimentales como ensayos de unión de radioligandos, técnicas inmunocitoquímicas, determinaciones de actividades enzimáticas y cuantificaciones de la expresión génica. Las principales conclusiones que se desprenden de este estudio son:

- En situaciones nocivas las células estudiadas responden aumentando los niveles totales de receptores mGlu. En neuronas corticales se ha observado el aumento de, al menos, un subtipo de receptor mGlu del grupo I.
- En todas estas condiciones se produce un aumento de los receptores A1, lo que podría justificar su papel neuroprotector previamente descrito. Se ha observado que cuando aumentan los receptores A2A la muerte celular es mayor.
- Los ratones SAM presentan disfunciones en los mecanismos de modulación de los receptores de adenosina con la edad.

ABSTRACT

Adenosine Receptors (AR) and Metabotropic Glutamate Receptors (mGlu) are implicated in several physiological processes. Adenosine in Central Nervous System (CNS) plays a neuromodulatory role controlling neuronal excitability through high affinity receptors A1 and A2A. These AR interact with other neurotransmitters and neuromodulators receptors and with adenosine transport systems. On the other hand, Glutamate, the main excitatory neurotransmitter in CNS, is implicated in transmission of nerve impulse and it may cause excitotoxic cell death. Glutamate acts through its receptors, which include ionotropic (ionic channels) and metabotropic (GPCR) glutamate receptors. Both AR and mGlu have been implicated in neuroprotection/neurodegeneration processes in several experimental models. These receptors are also modulated in some neurodegenerative diseases making them a potential target for new treatment strategies. In this report, the modulatory mechanisms that control AR and mGlu expressions is studied in neurons and glia exposed to different noxious stimuli as excitotoxicity, hypoxia, amyloid peptide and hydrogen peroxide. In addition, a complementary study of AR modulation during ageing has been carried out in senescence-accelerated mouse model (SAM). Different experimental approaches (radioligand binding assays, immunochemistry methods, enzymatic activities measurement and gene expression quantification) have been used to reach the previously indicated objectives. The main conclusions obtained in this research are:

- Noxious stimuli in neurons and glia increases total mGlu expression. In cortical neurons group I mGlu are up-regulated in each experimental condition.
- Adenosine A1 receptors are up-regulated in every studied situation, and this could be related to A1-mediated neuroprotection. When A2A receptors were up-regulated, cell death was increased.
- Adenosine receptors modulation during ageing is impaired in SAM model.

INTRODUCCIÓN

I.1. Receptores acoplados a proteínas G o de siete dominios transmembrana.

Los mecanismos de comunicación celular son imprescindibles para establecer relaciones adecuadas entre un organismo y su entorno. En el caso de los organismos pluricelulares, además, ha de ocurrir que cada célula del organismo funcione dependiendo de las necesidades del conjunto, para ello se necesita un sistema capaz de generar, transmitir y recibir señales de distinta índole, pero además estas señales han de producir una respuesta en la célula diana de manera que adecue su funcionamiento a las señales que recibe.

Por lo general, los sistemas de comunicación se basan en la existencia de receptores capaces de reconocer con una elevada afinidad y especificidad una determinada señal, cuya naturaleza no siempre es química. Por otro lado, estos receptores han de ser capaces de desencadenar una serie de eventos intracelulares como consecuencia de esta señal extracelular. Los mecanismos por los cuales se transforma en el interior de la célula un tipo de señal extracelular (primer mensajero) en otro intracelular (segundo mensajero) se conocen como mecanismos de transducción celular.

Los receptores son moléculas de elevado tamaño de carácter proteico las cuales normalmente atraviesan la membrana plasmática, al menos una vez, aunque se encuentran receptores en otros órganos subcelulares (receptores intracelulares), como es el caso de los receptores de hormonas esteroideas o los receptores de IP3 del retículo. En la presente *Memoria* nos ocuparemos de los receptores situados en la membrana plasmática o receptores transmembrana.

Estos receptores, al igual que las enzimas, poseen sitios estéreo-selectivos para el reconocimiento de ligandos específicos, de tal forma que el primer mensajero ejerce su efecto sobre la célula diana al unirse a su receptor específico formando un complejo ligando-receptor. A partir de esta primera unión se desencadenan una serie de procesos en la célula diana que varían en función de la naturaleza del primer mensajero, del receptor y del tipo celular al que llega el mensaje. Por tanto un mismo mensaje puede desencadenar respuestas distintas, incluso opuestas, dependiendo de la célula diana que lo reciba.

En general, existen dos tipos de respuestas celulares ante una determinada señal en función del tipo de receptor que la recibe. Por un lado, los receptores metabotrópicos, tras la detección de la señal, interaccionan de forma compleja con una serie de proteínas, denominadas proteínas G, las cuales interaccionan a su vez con distintos sistemas enzimáticos que, en último término, producen alteraciones bioquímicas en el interior celular en los niveles de segundos mensajeros. Por otro lado, los receptores ionotrópicos constituyen canales iónicos, los cuales, como consecuencia de la unión de su ligando, podrían variar su estado funcional permitiéndose la entrada o la salida de iones, lo que variaría el potencial de membrana.

Desde un punto de vista evolutivo los receptores acoplados a proteínas G (GPCR, del inglés *G protein-coupled receptors*) han supuesto un éxito, constituyendo entre el 1 y el 2 % de los genes de mamíferos (Pin y col., 2003). Esta familia de genes codifican, en el caso del genoma humano, para más de ochocientas proteínas, de las cuales, más de un 90% se expresan en SNC (George y col., 2002). Su gran éxito se debe a la capacidad que poseen de integrar mensajes de muy distinta índole, así las señales capaces de activar estos receptores pueden variar desde hormonas, péptidos o aminoácidos hasta sustancias de naturaleza física como

los fotones. Otro nivel de variabilidad se encuentra en la interacción con las proteínas G, ya que cada receptor, en función de su estructura, interacciona de forma específica con determinadas familias de proteínas G, cada una de las cuales ejerce un efecto característico en el interior celular. La siguiente ilustración trata de exponer esta heterogeneidad, tanto a nivel de ligandos como a nivel de efectos biológicos desencadenados.

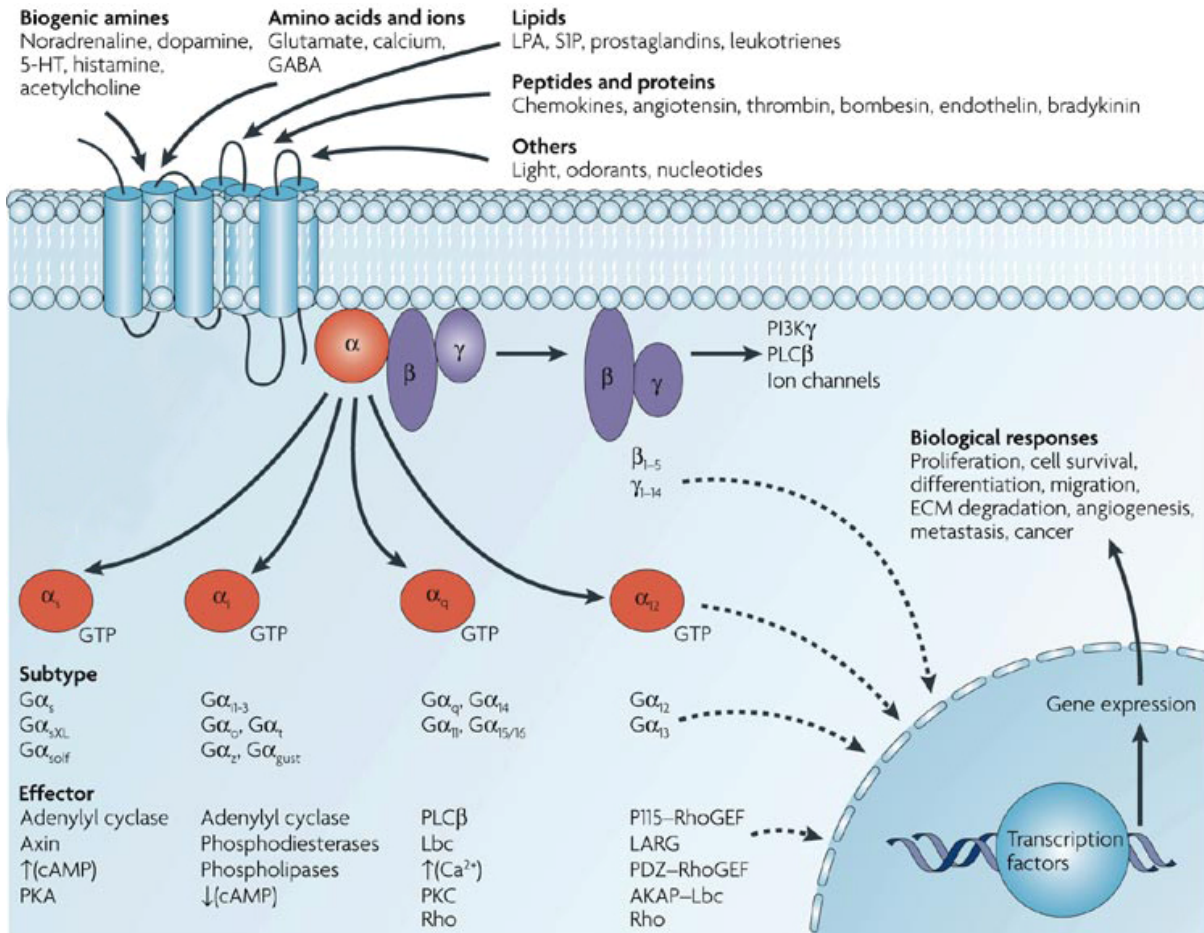


Ilustración 1: Representación esquemática de un GPCR. Varios ligandos usan los GPCRs para estimular determinadas dianas celulares. La unión de un agonista produce un cambio conformacional en el receptor, que cataliza el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α de la proteína G correspondiente, la cual se disocia de la subunidad $\beta\gamma$. Las subunidades α se dividen en varias subfamilias, las cuales median distintos efectos. Cada receptor interacciona de manera específica con una o varias familias de proteínas G (Modificado de [Dorsam y Gutkind, 2007](#)).

Durante años ha sido la prioridad de los farmacólogos dedicados al estudio de los receptores neuronales el diseño de ligandos potentes y selectivos para cada uno de los receptores descritos. La aproximación clásica que se empleó fue la de diferenciar los receptores en función de los agentes farmacológicos que los “encendían” o “apagaban”. Estos ligandos se conocen desde un punto de vista clásico como agonistas o antagonistas, respectivamente. En la actualidad se ha demostrado que los receptores se pueden encontrar en distintas conformaciones, cada una de ellas con una particular actividad biológica, siendo la más favorable para la señalización del receptor aquella estabilizada por un agonista, mientras que el empleo de agonistas inversos estabilizaría la conformación menos activa del receptor. El caso de los antagonistas es especial, ya que estos no

intervienen en el equilibrio entre la forma activa y la inactiva del receptor y, sin embargo, tienen la capacidad de bloquear el efecto tanto de los agonistas como de los agonistas inversos.

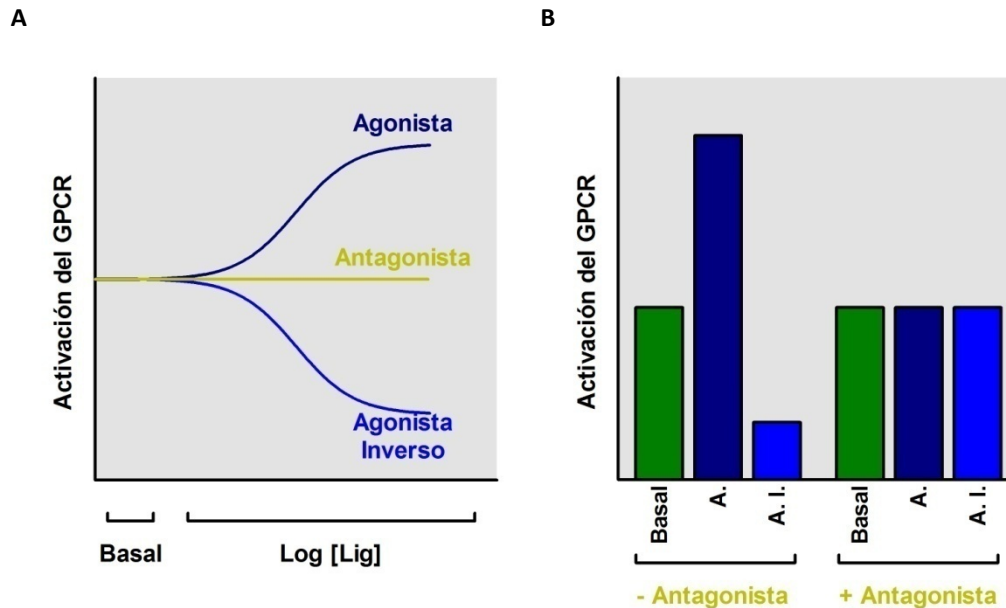


Ilustración 2: Modelo de activación de un GPCR. Panel A. Acción de los diferentes tipos de ligandos sobre el estado de activación del receptor. Panel B. El empleo de antagonistas específicos de un receptor bloquea el efecto observado sobre la activación del mismo ejercido por otros ligandos. Lig: ligando; A.: Agonista; A. I.: Agonista inverso (Modificado de [The state of GPCR research in 2004](#)).

I.1.1. Estructura de los GPCRs.

Todos los receptores englobados en esta superfamilia presentan una arquitectura común, su cadena polipeptídica atraviesa la membrana plasmática 7 veces, formando un motivo también llamado dominio heptahélico. La secuencia polipeptídica comienza en el extremo N-terminal, el cual se expone hacia el espacio extracelular. Los dominios transmembrana están formados por secuencias de 25 a 35 aminoácidos de carácter hidrófobo que adquieren la disposición de α -hélice, las cuales se encuentran conectadas por 6 bucles, 3 intra y 3 extracelulares, de longitud variable quedando el extremo C-terminal en el interior celular. Esta disposición permite que una parte del receptor quede expuesta al lado externo de la membrana plasmática, la cual será responsable de la interacción con el ligando, mientras que otra parte se expone hacia el lado intracelular, siendo esta responsable de la interacción con las proteínas G. En algunos receptores, los que reconocen ligandos de tamaño pequeño, esta estructura es suficiente para el correcto funcionamiento, ya que lo reducido del tamaño permite el correcto reconocimiento por los bucles extracelulares de esta estructura. Los receptores que reconocen ligandos de mayor tamaño presentan un extremo N-terminal más largo que, proyectado hacia el espacio extracelular, proporciona los sitios de reconocimiento necesarios.

Los GPCRs no sólo comparten este motivo estructural común, sino también un método intracelular de amplificación de la señal. Este método se basa en la interacción por parte de cada receptor con proteínas G específicas. Para ello es necesario que el extremo C-terminal interaccione con las cavidades formadas por los

bucles intracelulares 2 y 3 (para revisión ver [Bourne, 1997](#)), siendo la secuencia de estas cavidades particularmente importante para el reconocimiento de proteínas G características.

El primer receptor acoplado a proteínas G cuya estructura cristalina se resolvió fue el receptor de rodopsina bovino ([Palczewski y col., 2000](#)), desde entonces se ha recopilado abundante información acerca de la estructura, los residuos conservados a lo largo de la evolución y la funcionalidad en estos motivos tan conservados. No obstante, el estudio de estos receptores todavía arroja sorpresas, de hecho, se ha descrito recientemente la estructura del receptor A_{2A} humano y en ella se ha observado que los bucles extracelulares y las hélices transmembrana forman un bolsillo de unión del ligando distinto al de todos los GPCRs caracterizados hasta la fecha ([Jaakola y col., 2008](#)).

I.1.2. Clasificación de los GPCRs.

En la actualidad no existe un acuerdo global acerca de cómo organizar la clasificación de los GPCRs, de modo que diferentes bases de datos proporcionan información que en algunos casos resulta confusa, redundante o que engloba a grupos de receptores que solapan entre sí. Las clasificaciones realizadas hasta la fecha han respondido bien a aspectos biológicos, farmacológicos o computacionales. La dificultad de su clasificación radica en que, a pesar de que la estructura tridimensional se ha mantenido a lo largo de la evolución, la secuencia primaria de estos receptores apenas se parece ([Milligan, 2006](#)), lo que dificulta enormemente una clasificación basada en similitudes de secuencia así como la inclusión de nuevos receptores en una clasificación de este tipo ([Davies y col., 2007](#)). La clasificación más ampliamente utilizada es la establecida en la base de datos GPCRDB (accesible en www.gpcr.org/7tm/), también llamada clasificación A-F, que divide los GPCRs en 6 familias ([Horn y col., 2003](#)). Esta base de datos basa su clasificación en la información que ha ido recopilando desde su inicio en 1994 ([Kolakowski, 1994](#)) y contiene secuencias, mutaciones y datos de unión de ligandos. Recientemente ha sido desarrollada una herramienta informática gratuita para clasificar un GPCR huérfano a partir de su secuencia aminoacídica por comparación con todos los datos almacenados en esta base de datos ([Davies y col., 2008](#)).

Según esta clasificación la familia A o “similares a rodopsina” (*rhodopsin-like*) es la más abundante, agrupando más del 80% de los GPCRs en humanos, en este grupo se encuentran los receptores de adenosina. La familia B son los “similares a secretina” (*secretin-like*) y la C recibe el nombre por los receptores metabotrópicos de glutamato, aunque contiene otros receptores como los de GABA (ácido γ -aminobutírico). Las familias A, B, C y F se encuentran en mamíferos, al contrario que las familias D y E, las cuales son bastante menores, estando formada la primera por los receptores de feromonas sólo encontrados en hongos y la segunda por los receptores de AMPc descritos en *Dictyostelium*. La familia F es más pequeña todavía y recibe el nombre inglés de familia *Frizzled/smoothened*. La siguiente Figura representa las características estructurales básicas de las tres familias más abundantes de GPCRs.

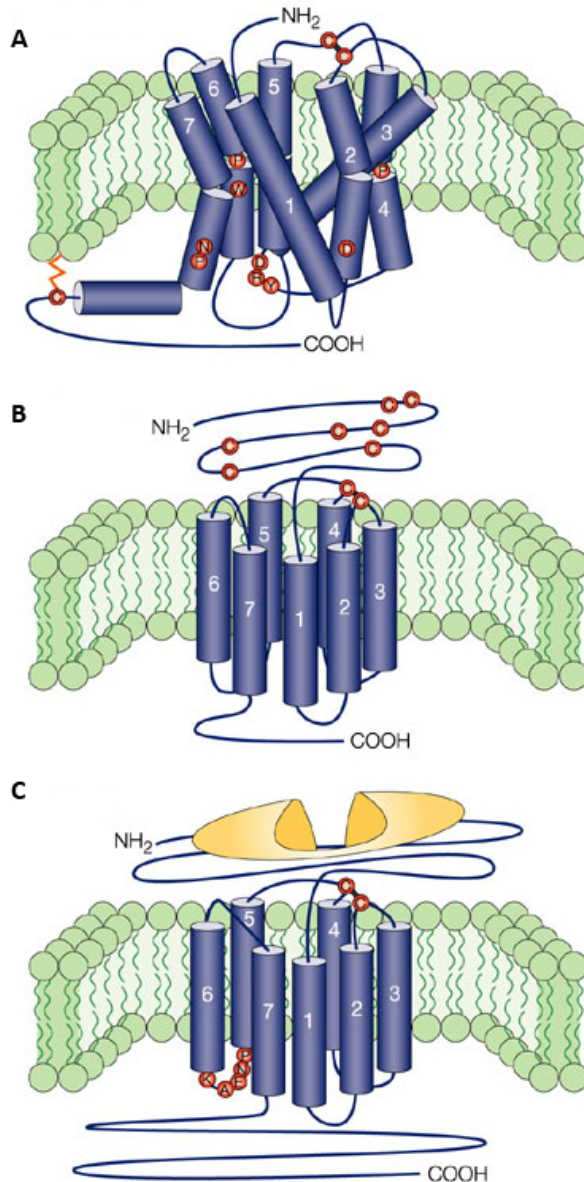


Ilustración 3: Aspectos estructurales más relevantes de las 3 principales familias de GPCRs. En todas las Figuras se exponen los aminoácidos altamente conservados, aunque la homología de secuencia entre los receptores de las distintas familias es baja. Panel A. La familia A está formada por receptores para ligandos de pequeño tamaño por lo que la región extracelular del receptor es pequeña. Las hélices transmembrana de estos receptores se orientan de forma inclinada con respecto a la membrana plasmática. Panel B. La familia B posee un extremo N-terminal más largo con abundantes cisteínas que probablemente forman una red de puentes disulfuro. Panel C. La familia C presenta grandes regiones C y N-terminales. La zona de reconocimiento del ligando se encuentra en el N-terminal que forma un módulo que recibe el nombre VFT (*Venus Fly Trap*) por su analogía con la planta carnívora (Modificado de [George y col., 2002](#)).

No obstante, aunque ésta sea la clasificación más ampliamente aceptada existen otras clasificaciones, como la GRAFS, que clasifica los GPCRs en cinco subfamilias cuyas iniciales dan lugar al nombre de la clasificación ([Fredriksson y col., 2003](#)). Dentro de cada subfamilia se establecen otras sub-subfamilias, en función de un origen evolutivo común.

I.1.3. La superfamilia de las GTPasas. Mecanismos de transducción de los GPCRs.

Las proteínas G son una familia de proteínas heterotriméricas formadas por tres subunidades denominadas α , β y γ , responsables de muchos procesos de transducción de señal y partícipes en multitud de procesos de interés tanto fisiológico como fisiopatológico. La característica común de esta familia de proteínas es que unen nucleótidos de guanina, en concreto intercambian GDP por GTP, gracias a la interacción con un receptor activado, pasando de un estado inactivo a otro activo, en el que la subunidad α , unida a GTP, se disocia del dímero $\beta\gamma$, permitiéndose así que ejerzan ambos los efectos correspondiente sobre las enzimas

diana dando lugar a la respuesta celular (revisado en [Pin y col., 2003](#)). La subunidad α cataliza la hidrólisis de GTP a GDP, volviendo la proteína G a su estado inactivo.

Desde su descubrimiento se ha considerado a estas proteínas como unos “interruptores moleculares” capaces de “encender” o “apagar” la actividad de otras moléculas. En realidad el proceso es más complicado ya que estas proteínas sólo ejercen su actividad cuando ellas mismas están activadas y ese tiempo, como se comentará a continuación, es determinado. En el estado inactivo la proteína G presenta una elevada afinidad por el GDP, no es hasta que un receptor activado por un ligando induce un cambio conformacional en la proteína G cuando se favorece la salida del GDP, dando lugar a un estado neutro de activación transitorio que termina con la rápida entrada de GTP en el complejo. Al aumentar la afinidad por el GTP también disminuye la interacción entre la subunidad α y el complejo estable $\beta\gamma$. De este modo tanto la subunidad α , unida a GTP, como el dímero $\beta\gamma$ ejercen sus efectos singulares sobre sus correspondientes dianas. Sólo mientras la subunidad α está activada (unida a GTP) es capaz de ejercer estos efectos, sin embargo, en este estado también es capaz de catalizar la hidrólisis de GTP a GDP, siendo la tasa de hidrólisis de cada proteína G la que determina el tiempo que este sistema esté activado. Una vez que se ha producido esta hidrólisis la subunidad α unida a GDP sufre un nuevo cambio conformacional que aumenta su afinidad por el complejo $\beta\gamma$, volviendo el sistema completo al estado inactivo o “apagado”. Este sistema permite que se amplifique la señal, obteniéndose a partir de un único mensajero primario la liberación de múltiples mensajeros secundarios en el citosol. La Ilustración 4 trata de esquematizar el proceso aquí explicado. Por último, otras proteínas de esta familia no están ligadas a GPCRs, como $p21^{ras}$, y en ellas el intercambio GDP por GTP y la posterior hidrólisis de éste están regulados por otras proteínas denominadas GNRP (*guanine release proteins*) y GAP (*GTPase-activating proteins*).

Esta superfamilia de proteínas está formada por unos cien miembros. En la Ilustración 1 ya se mostró la heterogeneidad de las proteínas G_α con 16 subtipos, además existen 5 subtipos de subunidades β y 14 tipos de subunidades γ (revisado por [Milligan y Kostenis, 2006](#)). Dado que cada subunidad ejerce una influencia característica sobre su(s) sistema(s) efector(es) y que una proteína G está formada por tres subunidades, la respuesta a una determinada señal podría variar en función del tipo de célula que la reciba y de las proteínas G acopladas a ese hipotético receptor, lo que confiere al sistema, además de una gran capacidad de amplificación, una gran flexibilidad de respuesta.

Existen multitud de moléculas efectoras, entre las que encontramos ciclasas, fosfolipasas, fosfodiesterasas o canales iónicos de membrana, por citar algunos. Debido a que los receptores estudiados en la presente *Memoria*, los de adenosina y los metabotrópicos de glutamato, están principalmente acoplados al sistema de la adenilato ciclasa y al de la fosfolipasa C sólo se describirán estos dos sistemas en la presente *Introducción*. No obstante hay que tener en cuenta que se trata de una visión simplificada, ya que estos dos ejemplos clásicos de cascadas de señalización iniciadas por activación de GPCRs no contemplan otras vías de señalización relativamente nuevas como la activación de las MAP quinasas ([Yamauchi y col., 1997](#)). Este fenómeno de señalización celular puede complicarse todavía más si se tiene en cuenta que los GPCRs pueden actuar como homo o heterodímeros, como se comentará más adelante (para revisión ver [Milligan, 2008](#)).

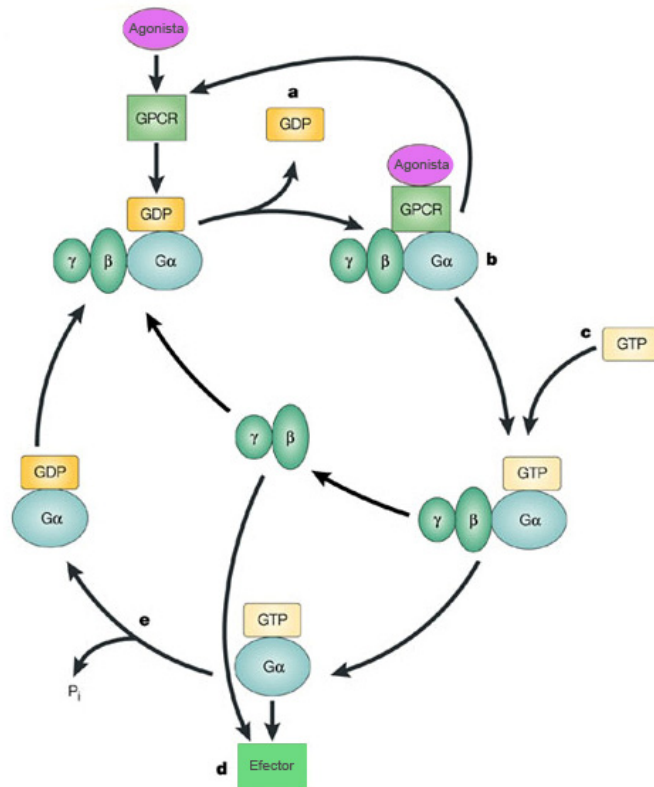


Ilustración 4: El ciclo de las proteínas G. La activación del GPCR promueve la salida del GDP (a) formándose un complejo ternario inestable (b). El GPCR activado cataliza la entrada de GTP en la subunidad α (c), lo que deshace el complejo ternario y promueve la disociación de la proteína G en la subunidad α y el dímero $\beta\gamma$. En estas circunstancias ambos son capaces de regular sus sistemas efectoros (d). La activación de la proteína G se termina por la hidrólisis de GTP en GDP (e), quedando cerrado el ciclo (Modificado de [The state of GPCR research in 2004](#)).

En primer lugar se comentará el efecto sobre las adenilato ciclasas. Esta familia de enzimas catalizan la formación de AMP cíclico (AMPc), un segundo mensajero ubicuo para todas las células animales. La subunidad $G_{\alpha i}$ inhibe la activación de este enzima, mientras que la subunidad $G_{\alpha s}$ ejerce el efecto contrario estimulando la actividad enzimática. El papel más importante del AMPc es activar la proteína quinasa dependiente de AMPc o PKA. Una vez activada, esta enzima multimérica emplea ATP para fosforilar a sus sustratos, que pueden variar entre enzimas, receptores, canales iónicos, histonas, factores de transcripción, etc. Esta fosforilación en un residuo de serina, treonina o tirosina ejerce el efecto de inhibir o activar la molécula biológica diana. Por último, la desfosforilación producida por cualquiera de las varias fosfatasas presentes en el citosol devuelve a estas proteínas a su estado inicial.

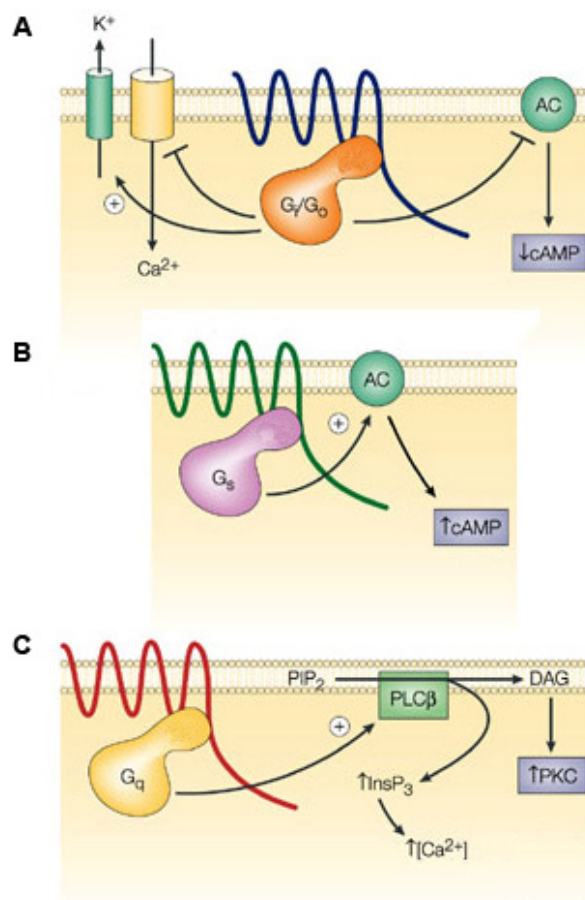
Mediante el empleo de técnicas de biología molecular se ha demostrado que existen, al menos, nueve subtipos de esta enzima diferentes en las células de mamífero, siendo la AC I la mayoritaria en tejido del SNC (revisado por [Hanoune y Defer, 2001](#)). Todas ellas presentan un peso molecular de entre 120 y 130 kDa con 12 segmentos transmembrana. Sin embargo, cada una de ellas presenta unas características de activación particulares, lo que unido a su diferente distribución, hacen de éste un sistema heterogéneo.

Una de las dianas de PKA es la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc o CREB (del inglés *cAMP responsive element-binding protein*), un factor de transcripción crítico para muchas funciones neuronales (revisadas por [Josselyn y Nguyen, 2005](#)). El factor CREB se activa por fosforilación por PKA, dimeriza y se transloca al núcleo promoviendo la transcripción de aquellos genes que posean elementos CRE (del inglés *cAMP response elements*) en sus promotores gracias a su interacción con la proteína CBP (del inglés *CREB-binding protein*), un co-activador de la maquinaria de transcripción. Por su parte CREM (del inglés *cAMP response element modulator*) es un factor de transcripción con capacidad de unirse a los elementos CRE, de

elevada homología con CREB y que también se activa por fosforilación por PKA, sin embargo, se ha observado que este factor puede funcionar como un activador o un represor de la actividad transcripcional (revisado por Foulkes y Sassone-Corsi, 1992). Una característica importante de estos factores es que son un punto de convergencia entre las rutas AMPc/PKA y las MAP quinasas (revisado por De Cesare y col., 1999).

Por otro lado se ha observado que la subunidad $G_{\alpha q}$ activa la fosfolipasa $C\beta$. La activación de este importante sistema efector embebido en la membrana plasmática conduce a la producción de dos segundos mensajeros, el inositol trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG), por conversión del fosfolípido fosfatidilinositolbisfosfato (PIP_2), localizado en la cara interna de la membrana plasmática. El IP_3 es una molécula soluble en agua que difunde a través del citosol, donde puede reaccionar con receptores en el retículo endoplásmico, desde el que se produce la liberación de calcio, el cual tiene múltiples efectos en la bioquímica celular. Por otro lado, el DAG es hidrófobo y permanece en la membrana plasmática, donde reacciona con la proteína quinasa dependiente de calcio (PKC), la cual también se encuentra anclada a la membrana plasmática, cuando la concentración de calcio citosólico ha aumentado (como consecuencia de la liberación de calcio del retículo antes mencionada). De este modo, la PKC está capacitada para activar proteínas por fosforilación, las cuales darán lugar a respuestas bioquímicas específicas. En neuronas se han descrito varios efectos como consecuencia de la activación de la PKC, que varían entre variaciones en la síntesis y secreción de neurotransmisores, alteraciones en la sensibilidad de los receptores así como alteraciones en la funcionalidad del citoesqueleto.

Ilustración 5: Los GPCR están acoplados a la familia de las proteínas G. Panel A. Los receptores acoplados a proteínas $G_{i/o}$ inhiben la enzima adenilato ciclasa y, en algunos casos, activan la salida de K^+ o inhiben la entrada de Ca^{2+} . Panel B. Los acoplados a proteínas G_s estimulan la formación de AMPc. Panel C. Otros receptores están acoplados a proteínas G_q lo que activa la $PLC\beta$, incrementando la hidrólisis de PIP_2 en IP_3 y DAG con el consiguiente aumento de Ca^{2+} y la activación de PKC (Modificado de The state of GPCR research in 2004).



I.1.4. Regulación de los GPCRs.

Está establecido que la mayoría de los GPCRs se regulan por fosforilación. Desde un punto de vista clásico, el fenómeno de la regulación de los GPCRs se ha asociado con los procesos de desensibilización como consecuencia de la exposición de estos receptores a su ligando, los cuales implican el desacoplamiento del receptor de las proteínas G efectoras (Hausdorff y col., 1989), la internalización del receptor a compartimentos intracelulares (revisado por Trejo, 2005) y la disminución del número de receptores debido a una menor tasa de síntesis así como una disminución en su expresión (Pak y col., 1999). Este mecanismo de desensibilización protege frente a la sobre-estimulación aguda y crónica, aunque el concepto de exposición aguda a agonista varía entre cada receptor, observándose que algunos se desensibilizan en minutos mientras que otros receptores necesitan horas de activación para observarse esta pérdida de respuesta (revisado por Tsao y col., 2001).

Las primeras quinasas capaces de mediar estos procesos de fosforilación fueron quinasas dependientes de segundo mensajero, como la PKA o la PKC (Benovic y col., 1985; revisado por Kelly y col., 2008). Sin embargo, el modelo evolucionó tras el descubrimiento de una nueva quinasa capaz de medir fenómenos de desensibilización independiente de segundos mensajeros (Benovic y col., 1986). Esta quinasa se englobó con posterioridad dentro de una familia de quinasas intracelulares denominadas GRK (del inglés, *G protein-coupled receptor kinase*). Sin embargo, la fosforilación del GPCR producida por estas quinasas no era condición suficiente para que se produjera la desensibilización (Pitcher y col., 1992), sino que esta fosforilación promueve la unión de unas proteínas denominadas β -arrestinas (Loshe y col., 1990) que desacoplan los receptores de las proteínas G iniciando así la desensibilización de la respuesta. Estas proteínas, al funcionar como adaptadores moleculares, marcan al receptor al que se han unido para que sufra un proceso de endocitosis por vesículas de clatrina. Una vez internalizados, la mayoría de los GPCR son desfosforilados en compartimentos endosomales y bien son reciclados de nuevo a la membrana plasmática, se envían a lisosomas para su degradación o, en algunos casos, se retienen en endosomas para ser reciclados lentamente a la superficie celular (revisado por Dhami y Ferguson, 2006). En la actualidad se han descrito otros mecanismos moleculares de desensibilización más complejos que dependen del tipo de receptor estudiado, como por ejemplo la internalización en caveolas, (revisados por Kelly y col., 2008). El mecanismo clásico de desensibilización se esquematiza en la Ilustración 6.

Los procesos de desensibilización pueden ser de dos tipos en función de los mecanismos que los desencadenan, comprendiendo, en general, cambios adaptativos tanto a nivel del GPCR como a nivel de las proteínas G y del sistema efector acoplado. Por un lado, existen los procesos de desensibilización homóloga, los cuales se caracterizan porque la pérdida de respuesta de un determinado GPCR es producida por la acción de un agonista selectivo sobre él mismo. Por otro lado, la desensibilización heteróloga implica la pérdida simultánea de respuesta a agonista de un GPCR como consecuencia de la activación crónica de otro GPCR distinto. Una vez que la exposición a agonista se ha restringido, la respuesta del GPCR puede, en la mayoría de los casos, ser recobrada mediante un proceso pobremente comprendido llamado resensibilización (revisado por Ferguson y col., 1998), aunque para la mayoría de los receptores se recicla y parte se degrada (Escribiche y col., 2003).

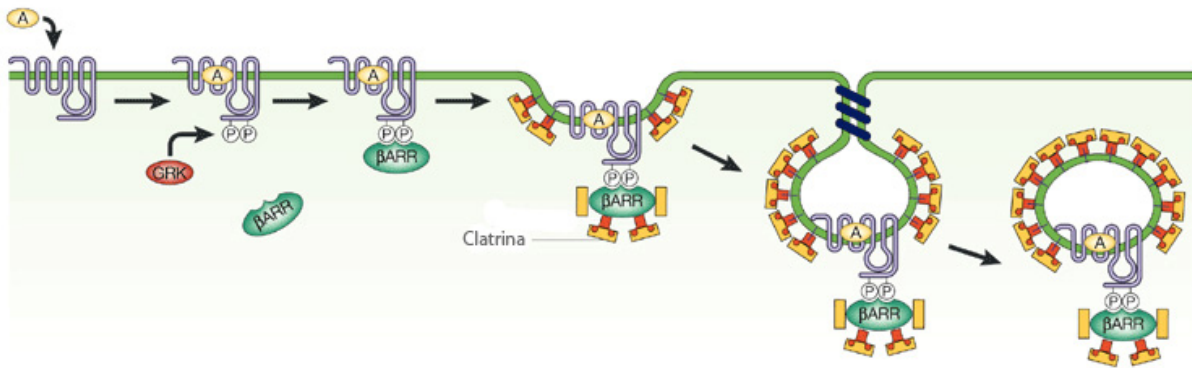


Ilustración 6: Modelo clásico de internalización de los GPCR. Debido a la unión crónica del agonista (A) el GPCR es susceptible de ser fosforilado por una GRK en residuos del tercer giro intracelular y del carboxilo terminal, reclutando así a las β-arrestinas (BARR). Estas proteínas reclutan a la clatrina, que conducirá el proceso de endocitosis (Modificado de [Pierce y Lefkowitz, 2001](#)).

Por otro lado, los procesos de fosforilación de los GPCR no sólo están relacionados con la desensibilización de un determinado receptor con el fin de proteger el sistema de una sobre-estimulación, sino que, además, las β-arrestinas unidas al receptor funcionan a modo de adaptadores moleculares. De este modo, la unión de esta familia de proteínas al receptor fosforilado inicia otros procesos de señalización celular diferentes a los característicos del receptor al que se han unido (revisado por [DeWire y col., 2007](#)), como por ejemplo, la activación de la vía de señalización de las quinasas activadas por mitógenos (MAP, del inglés *mitogen-activated protein kinases*). De forma adicional, el fenómeno de dimerización que sufren los GPCR añade otro nivel de complejidad a estos procesos (revisado por [Terrillon y Bouvier, 2004](#)). Estos motivos hacen que la visión clásica de la regulación de los GPCR tenga que ser actualizada con regularidad. Además, existen evidencias de que los mecanismos estudiados para un tipo de receptor no puedan ser aplicables de modo general a otro distinto, e incluso de que varios subtipos de un mismo receptor, activados por un mismo agonista, puedan seguir mecanismos de desensibilización diferentes.

Por último, este proceso de regulación varía en función del tipo celular, ya que en cada tipo celular se expresan unas determinadas quinasas que presentan diferentes mecanismos de activación, las cuales fosforilan a sus receptores diana en distintos lugares y con diferentes cinéticas. Todo ello tiene unas consecuencias comunes, como la desensibilización del receptor, pero también unas características únicas que dependen de las particularidades de cada tejido y que dan lugar a un amplio abanico de modelos de señalización, lo que añade a estos receptores nuevos niveles de complejidad, diversidad y capacidad de adaptación frente a distintos estímulos (revisado por [Tobin y col., 2008](#)). La siguiente Figura resume estos nuevos niveles de complejidad.

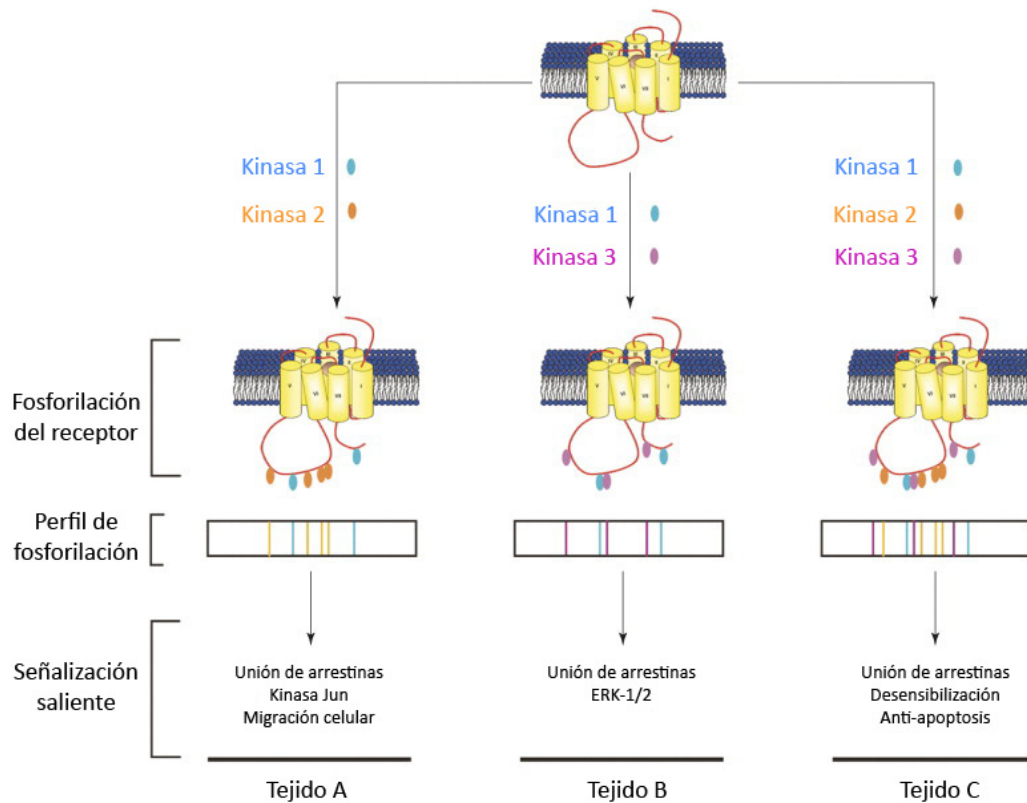


Ilustración 7: La fosforilación diferencial de los GPCR implica la activación de mecanismos efectores característicos. En el esquema tres diferentes quinasas son capaces de fosforilar en distintos sitios a un determinado GPCR en función del tejido, dando lugar a diferentes perfiles de fosforilación. Estos perfiles de fosforilación dirigen la señalización celular subsiguiente, produciendo en los distintos tejidos (A, B o C) los procesos de señalización requeridos (Modificado de [Tobin y col., 2008](#)).

I.2. El glutamato y sus receptores.

La acción excitadora del glutamato en cerebro y médula espinal de mamíferos se conocía desde la década de los 50 del siglo pasado ([Hayashi, 1952](#)), sin embargo no fue hasta el final de la década de los 70 cuando se reconoció abiertamente que el glutamato era el principal neurotransmisor excitador del SNC, desempeñando, por tanto, una amplia variedad de funciones dentro de dicho sistema. En un principio se creía que la función del glutamato estaba ligada sólo a su acción sobre canales iónicos de membrana activados por ligando, los receptores ionotrópicos de glutamato (revisados por [Dingledine y col., 1999](#)). Sin embargo, a mediados de los 80 aparecieron evidencias de la existencia de receptores de glutamato acoplados a sistemas de segundos mensajeros a través de proteínas G, debido a la capacidad del glutamato de activar la hidrólisis de fosfoinosítidos ([Sladeczek y col., 1985](#)). Así se descubrió lo que hoy conocemos como la familia de receptores metabotrópicos de glutamato, acoplados a los sistemas efectores a través de proteínas G heterotriméricas.

Los receptores ionotrópicos de glutamato son canales iónicos situados preferentemente a nivel postsináptico, aunque su permeabilidad a Na^+ y Ca^{2+} varía en función de la composición multimérica de cada receptor. Existen tres familias de estos receptores, denominadas así por sus tres principales agonistas: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y ácido kaínico. Estos canales regulan procesos de transporte de iones de un lado a otro de la membrana plasmática. Por tanto,

una vez activados por su ligando, estos canales se abren formando un poro que permite el flujo de los iones seleccionados a través de un gradiente electroquímico, produciéndose cambios en el potencial de membrana que dan lugar en la sinapsis a los procesos de despolarización e hiperpolarización característicos de la transmisión nerviosa. El cambio en el potencial de membrana representa una señal que será procesada en la célula receptora, la magnitud y duración de esta señal depende de varios factores que no serán comentados en la presente *Memoria* (revisados en [Madden, 2002](#)).

Con respecto a los receptores metabotrópicos de glutamato el primer ADNc clonado fue el del mGlu_{1a}, el cual fue clonado, a la vez y de manera independiente, por dos grupos ([Houamed y col., 1991](#); [Masu y col., 1991](#)). La secuenciación de este gen no presentaba homología significativa con ninguna familia génica de GPCR conocida entonces, lo que sugería que formaba parte de una nueva familia de receptores, aunque, como se ha comentado con anterioridad, esta hipótesis ya se había propuesto a finales de la década de los 80. En la búsqueda de nuevos miembros de esa familia de genes se han llegado a clonar hasta 8 receptores distintos más las correspondientes variantes de procesamiento o *splicing* alternativo para algunos de ellos.

I.2.1. Clasificación de los receptores metabotrópicos en función de su estructura, bioquímica y farmacología.

Durante el periodo de 1991 a 1995 se describió el clonaje de la familia de receptores metabotrópicos de glutamato en mamíferos, en la actualidad se conocen 8 subtipos de estos receptores, numerados del 1 al 8 según orden de secuenciación. Basándonos en la homología de secuencia estos receptores se pueden clasificar a su vez en tres grupos, con aproximadamente un 70 % de homología entre componentes de un mismo grupo, pero con sólo un 40% entre componentes de los distintos grupos ([Schoepp, 2001](#)), además esta clasificación coincide con los mecanismos de transducción principales utilizados por cada subtipo de receptor. De los grupos I y III existen variantes de *splicing*, denominadas según el alfabeto romano por orden de secuenciación, observándose que la mayoría de los aminoácidos cambiados se encuentran en las regiones carboxilo terminal, lo que podría ser importante a la hora de localizar estos receptores en distintas regiones celulares ([Boudin y col., 2000](#)), siendo estas pequeñas variaciones suficientes para otorgarles a los receptores resultantes funciones fisiológicas diferentes ([Mion y col., 2001](#)). A modo de resumen se muestra la Tabla 1, donde se engloban las principales características de estos receptores (revisado por [Pin y Duvoisin, 1995](#); [Conn y Pin, 1997](#)).

El grupo I incluye los subtipos 1 y 5. En cada sistema de expresión estudiado, así como en todos los sistemas *in vivo*, los mGlu del tipo I estimulan la fosfolipasa de tipo C a través de una proteína G_{q/11} ([Sladeczek y col., 1985](#)) y, por tanto, la hidrólisis de fosfoinosítidos, dando lugar a los segundos mensajeros IP₃ y diacilglicerol. Existen al menos dos tipos de canales de calcio que regulan su liberación de reservorios intracelulares: canales sensibles a IP₃ ([Thorn y col., 1993](#)) y canales sensibles a rianodina, ambos situados en retículo endoplásmico. El IP₃ interacciona con su receptor abriéndolo y es usado en muchas células como segundo mensajero para liberar calcio. Por su parte, el canal sensible a rianodina es responsable del efecto

conocido como liberación de calcio inducida por calcio (*calcium-induced calcium release*, [Fabiato y Fabiato, 1977](#)). Por otro lado, la producción de DAG y/o la liberación de calcio son capaces de activar diferentes isoformas de la PKC (revisadas en [Webb y col., 2000](#)) las cuales fosforilarán a sus sustratos específicos, provocando en última estancia la regulación de la expresión génica (Ilustración 8).

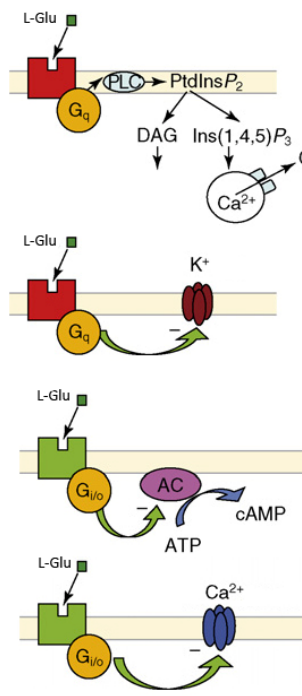
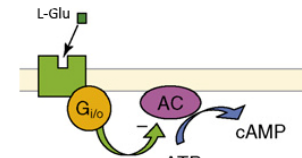
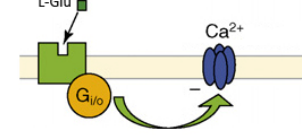
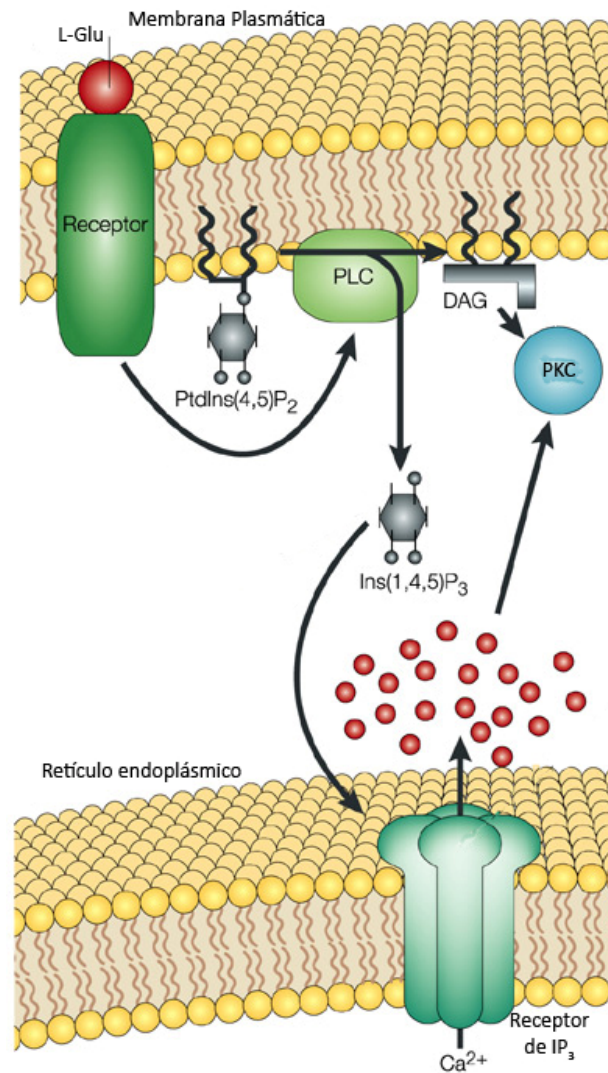
Grupo	Subtipos	Principales rutas de transducción	Agonistas selectivos	Antagonistas selectivos
I	mGlu1a		L-Quis (S)-DHPG CHPG (mGlu5)	AIDA LY367385 (mGlu1) CPCCOEt (mGlu1) MPEP (mGlu5)
	mGlu1b			
	mGlu1c			
	mGlu1d			
	mGlu5a			
	mGlu5b			
II	mGlu2		DCG-IV (2R,4R)-APDC	MCCG LY341495 EGLU
	mGlu3			
	mGlu4a			
III	mGlu4b		L-AP4 L-SOP	MeSOP MAP4 CPPG
	mGlu6			
	mGlu7a			
	mGlu7b			
	mGlu8a			
	mGlu8b			
	mGlu8c			

Tabla 1: Resumen de las rutas de transducción principales y farmacología de los mGluRs. Adaptado de [Hermans y Challiss, 2001](#) y [Nicoletti y col., 2007](#).

Además de estimular la hidrólisis de fosfoinosítidos, se han estudiado casos de acoplamientos alternativos (comúnmente llamados “promiscuos”) con otros sistemas de señalización, los cuales normalmente contribuyen a la complejidad de las respuestas fisiológicas a glutamato. En este sentido se han descrito casos en los que los receptores del grupo I modulan los niveles de AMPc y con ello la actividad PKA, a través de un proteína estimuladora G_s , en sistemas heterólogos ([Aramori y Nakanishi, 1992](#)). Otras rutas atípicas observadas para este grupo son la activación de la fosfolipasa D en hipocampo ([Boss y Conn, 1992](#)), la cual algunos autores sugieren que es producida por un receptor mGlu aún por caracterizar ([Albani-Torregrossa y col., 1999](#)), la activación de la fosfolipasa A_2 en neuronas estriatales, al ser estimulados junto con los receptores NMDA ([Dumuis y col, 1990](#)), y el incremento en la cantidad de GMPc en cerebelo ([Okada, 1992](#)). Por otro lado, la

activación de estos receptores también afecta a los canales iónicos, así se ha establecido que la señalización mediante proteínas $\beta\gamma$ puede modular de forma negativa canales de calcio operados por voltaje (Kammermeier e Ikeda, 1999), mientras que los canales de potasio pueden ser inhibidos por un mecanismo dependiente de la PKC (Sharon y col., 1997).

Ilustración 8: Activación de los receptores mGlu del grupo I. La unión del agonista sobre los receptores mGlu₁ o mGlu₅ produce la activación de la enzima PLC, lo que conduce a la formación de IP₃ y DAG. El IP₃ difunde hacia el interior celular activando sus receptores del retículo, lo que produce la liberación de calcio al interior celular. En estas condiciones se activa la enzima PKC (Adaptado de Cullen y Lockyer, 2002).



Los receptores del grupo II, que incluye los subtipos 2 y 3, y los del grupo III, que incluye los subtipos 4, 6, 7 y 8, están principalmente acoplados de manera inhibitoria a la actividad adenilato ciclasa, mediante una proteína $G_{i/o}$, así como a varios tipos de canales de calcio. La disminución en los niveles de AMPc producida por la activación de estos receptores implica necesariamente una disminución en la actividad de la quinasa PKA. La capacidad inhibitoria de estos receptores sobre los incrementos de AMPc estimulados por forskolina se ha demostrado en diferentes estudios, tanto en sistemas heterólogos (Tanabe y col., 1993) como en neuronas en cultivo (Prezeau y col., 1994). Por otro lado, estos receptores también modulan la actividad de canales iónicos, inhibiendo la entrada de calcio a través de canales iónicos operados por voltaje (Trombley y Westbrook, 1992).

Sin embargo, se han descrito otras posibles vías de actuación de estos receptores en función del tejido y del agonista utilizado. Un caso especial es el del mGlu₆ acoplado a una fosfodiesterasa que reduce los niveles de GMPc en las células ON de la retina (Masu y col., 1995).

La capacidad de los receptores metabotrópicos de glutamato para interactuar con sistemas de segundos mensajeros, así como su capacidad de iniciar rutas de señalización de forma independiente de proteínas G, hacen de este un sistema versátil a la hora de activar diferentes vías de señalización. Los receptores metabotrópicos de glutamato activan una de las vías mejor caracterizadas en los procesos de regulación, la vía de las MAP quinasas, regulando de esta manera la expresión génica (revisado por Wang y col., 2007). Cada grupo de receptores activa esta vía mediante distintos mecanismos y a distintos niveles, que varían en función del sistema estudiado pero que, en general, están relacionados con la *trans*-activación de receptores con actividad tirosina quinasa (Peavy y col., 2001), con la interacción directa de los receptores metabotrópicos con la familia de proteínas adaptadoras Homer (revisado por Thomas, 2002), la señalización independiente de proteínas G por interacción con la familia Src (Heuss y col., 1999) o bien con la activación de ERK a través de subunidades $\beta\gamma$ ligadas a receptores de los grupos II y III, que ligan las proteínas heterotriméricas con la vía de Ras (Crespo y col., 1994). En la actualidad está descrita la activación de otras rutas de señalización por parte de estos receptores como pueden ser la ruta de JNK y la de la p38, aunque no están tan ampliamente descritas como la activación de las MAP quinasas. La Ilustración 9 esquematiza la complejidad de los procesos expuestos.

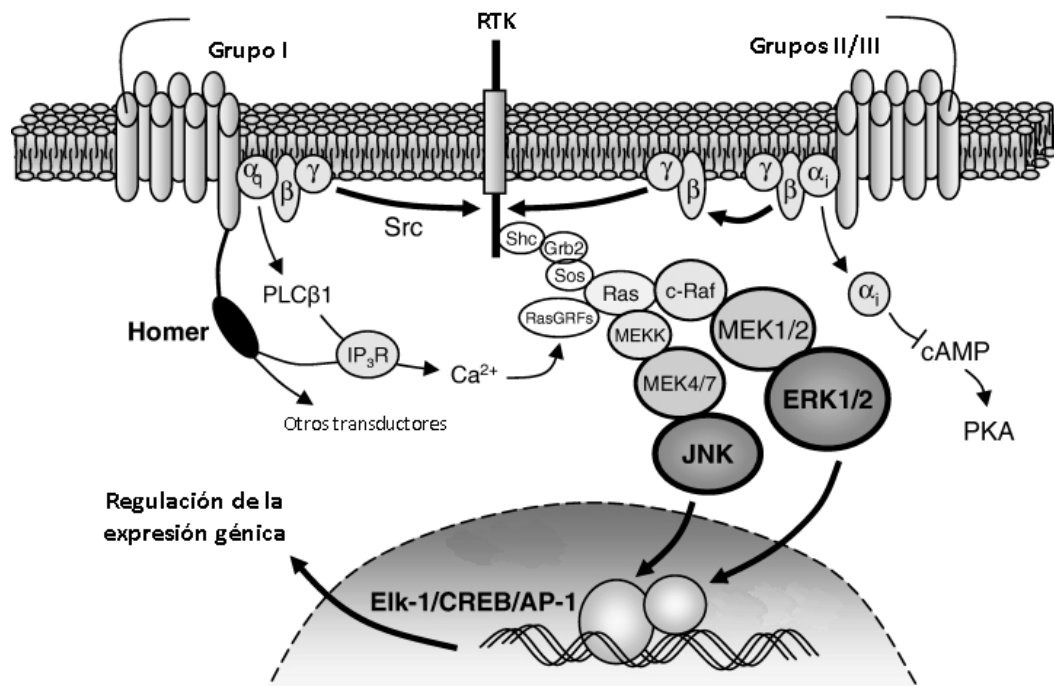


Ilustración 9: Cascadas de señalización inducidas por la activación de los receptores mGlu. Existen varias rutas que ligan los receptores metabotrópicos de glutamato con las vías de ERK y JNK: la *trans*-activación de receptores con actividad tirosina quinasa (RTK), la ruta clásica de aumento de calcio intracelular a través de un proteína G_{aq} , por acción de las subunidades $\beta\gamma$ y mediante los complejos formados con los adaptadores de la familia Homer (Modificado de Wang y col., 2007).

Una particularidad de los receptores metabotrópicos de glutamato y, en general de todos los receptores incluidos dentro de la familia C de GPCR, es que funcionalmente son dímeros, pudiendo encontrarse en forma de homo o hetero-dímeros (revisado por [Pin y col., 2003](#)). La primera evidencia de este fenómeno en los receptores metabotrópicos de glutamato se obtuvo en la década de los 90, cuando se observó que la movilidad electroforética del receptor mGlu₅ no se correspondía con el peso molecular esperado, quedando demostrado que éste receptor se comportaba como un dímero mediante la formación de puentes disulfuro ([Romano y col., 1996](#)). Este fenómeno no sólo es importante a la hora de determinar los posibles mecanismos de activación de estos receptores, sino que tiene una importancia mayor al ser considerados los fenómenos de transducción que llevan a cabo estos receptores, aumentando así el grado de diversidad y plasticidad de las estructuras que contienen estos receptores, especialmente el cerebro.

I.2.2. Papel fisiológico de los receptores metabotrópicos de glutamato.

A pesar de que el papel de los receptores metabotrópicos de glutamato se ha restringido tradicionalmente a su función moduladora de la acción del glutamato en las sinapsis excitadoras del SNC, donde se le atribuyen funciones fisiológicas tales como la participación en procesos cognitivos, de aprendizaje o relacionados con la memoria, así como en el desarrollo del SNC (revisado por [Luján y col., 2005](#)). No obstante, según se van ampliando los ámbitos de estudio se van añadiendo nuevas funciones para estos receptores. De hecho, están apareciendo evidencias que amplían la función de los receptores metabotrópicos de glutamato a sistemas diferentes del SNC. En este sentido, estos receptores se han caracterizado en varias células periféricas como osteoclastos, osteoblastos, hepatocitos, células pancreáticas, células del sistema inmune y en tejidos como la piel o el corazón ([Shin y col., 2008](#); revisado por [Skerry y Genever, 2001](#)). Por otro lado, se ha relacionado estos receptores con el control del crecimiento de tumores, no sólo circunscritos al SNC, sino tumores tan diferentes a los cerebrales como los melanomas ([Nicoletti y col., 2007](#); [Shin y col., 2008](#)). Recientemente, tras el inicio de la investigación con células madre, se ha establecido una relación directa entre los receptores metabotrópicos de glutamato y la proliferación, supervivencia y diferenciación de éstas células madre, tanto embrionarias como neurales ([Melchorri y col., 2007](#)), lo que permitiría, mediante la manipulación de estos receptores, la optimización de los protocolos de expansión y diferenciación celular encaminados a la sustitución de tejidos dañados. Por todos estos antecedentes, y los que se expondrán a continuación, se ha considerado históricamente a los receptores metabotrópicos de glutamato buenas dianas farmacológicas para abordar enfermedades neurológicas y psiquiátricas. En la actualidad, además se cree que pueden ser buenas dianas para el tratamiento de enfermedades variadas como esquizofrenia, ansiedad, depresión, Parkinson, dolor crónico, drogodependencias, migrañas, etc ([Nicoletti y col., 2008](#)).

En el SNC el glutamato es liberado en los terminales sinápticos y actúa a nivel postsináptico sobre los receptores ionotrópicos mediando transmisiones sinápticas rápidas. Sin embargo, el glutamato también puede actuar sobre los receptores metabotrópicos ejerciendo una variedad de efectos moduladores a través de la capacidad de estos receptores de activar sistemas de segundos mensajeros. A continuación se expondrán las principales funciones fisiológicas de los receptores metabotrópicos de glutamato en el SNC.

Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I.

Los receptores del grupo I se encuentran en las sinapsis excitadoras glutamatérgicas principalmente a nivel postsináptico (revisado por [Anwyl, 1999](#)), donde desempeñan un papel importante en la regulación de la sinapsis rápida mediada por glutamato y en los procesos de plasticidad neuronal.

Por otro lado, existen evidencias menos abundantes de su presencia a nivel presináptico, encargándose en médula espinal de funciones como el mantenimiento de la locomoción ([Takahashi y Alford, 2002](#)), aunque también se han descrito en corteza, donde, al igual que en la médula, facilitan la liberación de glutamato ([Musante y col., 2008](#)).

Los estudios de ratones *KO* (del inglés, *knock-out*) para el gen codificante para el receptor mGlu₁ desvelaron que este receptor está implicado directamente en el aprendizaje asociativo y motor ([Aiba y col., 1994a, b](#)), mientras que el *KO* para el mGlu₅ parecía no desarrollar adicción a cocaína ([Chiamulera y col., 2001](#)).

Se han encontrado receptores metabotrópicos del grupo I funcionales en la membrana nuclear, donde su activación produce incrementos de calcio en el interior del núcleo ([O'Malley y col., 2003](#); [Jong y col., 2005](#)). Sin embargo, se desconoce en la actualidad el mecanismo de activación que siguen estos receptores nucleares así como las posibles implicaciones fisiológicas que pudieran tener estos incrementos de calcio en la regulación de la transcripción génica o incluso del ciclo celular.

Por último, se ha demostrado recientemente que la presencia de mGlu₁ desempeña un papel crucial en la supervivencia de las neuronas durante el desarrollo del SNC, otorgándole a este receptor nuevas funciones hasta la fecha desconocidas ([Pshenichkin y col., 2008](#)).

Receptores metabotrópicos de glutamato de los grupos II y III.

Los receptores de estos grupos se sitúan principalmente a nivel presináptico, donde controlan la liberación de glutamato (revisado por [Cartmell y Schoepp, 2000](#)). La situación en el terminal presináptico de estos receptores y la capacidad para inhibir la liberación de glutamato tras su activación, hacen que se consideren auto-receptores. En sentido estricto, los auto-receptores se activan por el glutamato que el mismo terminal nervioso está liberando, lo que produce una disminución en la liberación del mismo. No obstante, estos receptores pueden encontrarse también en sinapsis GABAérgicas vecinas, donde modulan la liberación de GABA, un neurotransmisor de carácter inhibitor ([Chen y Bonham, 2005](#); [Ren y col., 2007](#)), regulando así la excitabilidad neuronal en el SNC (revisado por [Schoepp, 2001](#)). La Ilustración 10 esquematiza los fenómenos aquí descritos.

Por otro lado, existen evidencias de la presencia de estos receptores a nivel perisináptico ([Shigemoto y col., 1997](#)), aunque no están claras las condiciones fisiológicas requeridas para su activación ni el papel fisiológico que desempeñan.

Existen estudios recientes que relacionan la pérdida de los receptores del grupo II con la fisiopatología de trastornos depresivos ([Matrisciano y col., 2008](#)). Además, la eliminación génica de estos dos receptores en

ratones permitió descubrir las funciones opuestas que estos receptores desempeñan en procesos de neuroprotección-neurodegeneración en neuronas y glía, siendo la activación de los receptores mGlu₃ de astrocitos neuroprotectora frente a agentes tóxicos mientras que la de mGlu₂ en neuronas resultaba perjudicial (Corti y col., 2007).

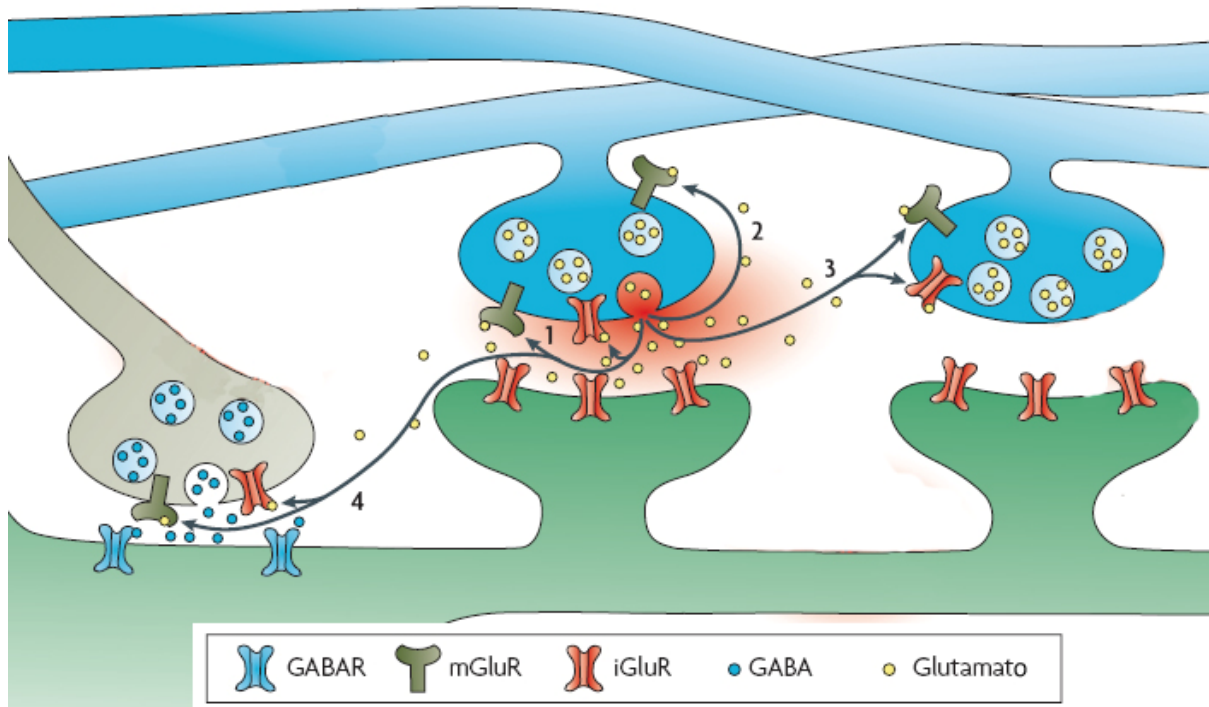


Ilustración 10: Modos de activación de los receptores mGlu de los grupos II/III presinápticos. Los receptores localizados en terminales cercanos a los sitios de liberación de glutamato pueden actuar como auto-receptores y modular la transmisión sináptica (1). Dada la particular geometría de algunas sinapsis el glutamato podría actuar sobre receptores situados extra-sinápticamente (2). El glutamato excedente del espacio extracelular podría actuar sobre varios receptores presentes tanto en neuronas glutamatergicas como GABAérgicas (3 y 4). (Modificado de Pinheiro y Mulle, 2008).

El estudio realizado en ratones *KO* para el receptor mGlu₇ propone a estos receptores como posibles dianas terapéuticas a la hora del desarrollo de fármacos anticonvulsivos, pudiendo estar directamente relacionados con trastornos psicomotores como la epilepsia (Sansig y col., 2001). Por otro lado, los *KO* para los receptores mGlu₄ evidencian la implicación de éstos en la función motora (Pekhlitski y col., 1996).

1.3. La adenosina en el Sistema Nervioso Central.

La adenosina es un nucleósido de purina ampliamente distribuido en todas las células del organismo. Las características que definen los neurotransmisores son varias, entre ellas se incluye que deben ser sintetizados por la neurona que los libera, que se almacenan en vesículas o que se requiere estimulación a nivel presináptico para su liberación. Ya que la adenosina no se ajusta a estos requerimientos y, por tanto, no puede ser considerada un neurotransmisor, se define su función como la de un neuromodulador de la transmisión

nerviosa ([Ribeiro, 1979](#)), una sustancia que modula el acceso al espacio extracelular tanto de neurotransmisores como de otras sustancias y metabolitos ejerciendo importantes funciones tanto dentro como fuera del SNC. En este sentido se dice que la adenosina ha sido diseñada para controlar el flujo de información entre neuronas más que para transferir directamente información entre neuronas, como hacen los neurotransmisores (revisado por [Cunha, 2005](#)). Por otro lado, tanto la adenosina como sus derivados son constituyentes esenciales de toda célula viva, ya que son constituyentes de metabolitos tan importantes como el ATP, de segundos mensajeros como el AMPc, de cofactores como el NADH y además forma parte de la estructura de los ácidos nucleicos.

Bajo condiciones fisiológicas normales, la adenosina actúa como agente promotor del sueño regulando el ciclo sueño-vigilia. De este modo, se ha comprobado que durante períodos de vigilia prolongados la adenosina se acumula mientras que durante el sueño los niveles se reducen ([Benington y col., 1995](#)). Además, la adenosina participa en multitud de procesos fisiológicos en condiciones basales, como se describirá más adelante, encontrándose tanto intra como extra-celularmente. La concentración de adenosina en ambos compartimentos se debe tanto a los enzimas que controlan su síntesis y degradación como a los transportadores de membrana. La concentración de adenosina intracelular se considera entre 10-50 nM (revisado por [Cunha, 2001](#)), mientras que a nivel extracelular varía según los autores, encontrándose generalmente en el rango 25-250 nM (revisado por [Dunwiddie y Masino, 2001](#)). Estos niveles de adenosina están fuertemente influenciados por la carga energética de la célula, de modo que, en condiciones en las que las tasas de gasto energético empleado por una célula son superiores a las tasas en las que esa célula obtiene nutrientes que le permitan realizar dicho gasto, se observa un incremento de la concentración de adenosina como consecuencia del metabolismo del ATP. En este sentido, una actividad neuronal alta, como ocurre de forma particular en los procesos de hipoxia o isquemia, conlleva un incremento en los niveles de este nucleósido (revisado por [Newby, 1991](#)).

En general se le atribuyen dos papeles principales a la adenosina ([Cunha y col., 2001a](#)), por un lado actúa como modulador homeostático, señalizando situaciones de estrés metabólico, y por otro, de mayor importancia en SNC, controla la liberación de neurotransmisores y con ello la excitabilidad neuronal (revisado por [Cunha, 2008](#)). La formación de adenosina en el medio extracelular puede producirse principalmente por dos mecanismos, bien siendo liberada por transportadores, de tipo equilibrativo, desde el interior celular o bien a partir de nucleótidos de adenina extracelulares, principalmente ATP, por acción de las ectonucleotidasas. La adenosina intracelular puede ser formada por la acción de varias enzimas en condiciones de estrés celular, principalmente, tras una serie de pasos, por hidrólisis de ATP (revisado por [Fredholm y col., 2005b](#)). Todos estos procesos están altamente regulados por el balance energético del tejido en cuestión ([Deussen, 2000](#)) y se ha observado la desregulación de estos procesos en varias condiciones patológicas (revisado por [Latini y Pedata, 2001](#)). La siguiente Ilustración esquematiza este proceso.

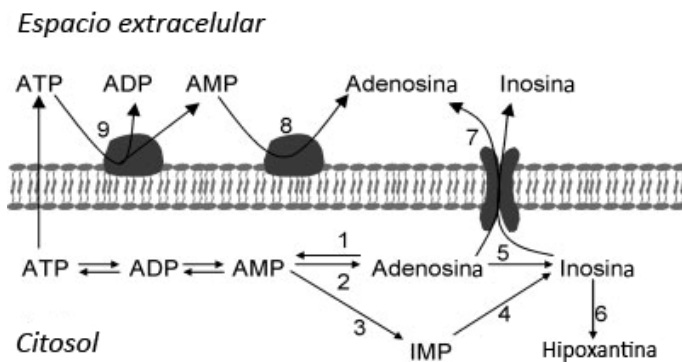


Ilustración 11: Representación esquemática de las enzimas y transportadores que regulan los niveles de adenosina. La adenosina puede formarse a partir de AMP por acción de las 5'-nucleotidasas citosólicas tipo I (2) o extracelulares (ecto 5'-nucleotidasas, 8), puede ser fosforilada por la adenosina quinasa (1) o transformarse por la adenosina desaminasa (5). Su transporte está regulado por los transportadores equilibrativos o concentrativos (7). Otras enzimas relacionadas con el metabolismo de las purinas son la AMP desaminasa (3), 5'-nucleotidasa de tipo II (4), purina nucleósido fosforilasa (6) y la apirasa (9). Modificado de Parkinson y col., 2006.

Las purinas ejercen sus efectos a través de los receptores purinérgicos. La adenosina lo hace a través de los receptores de adenosina, familia formada por 4 miembros y denominada P1, el ATP lo hace a través de los receptores P2, entre los que encontramos los receptores ionotrópicos P2X y los metabotrópicos P2Y (para revisión ver Burnstock, 2008).

I.3.1.Receptores de adenosina: clasificación, localización, rutas de señalización y funciones en el SNC.

La activación de los distintos tipos de receptores de adenosina puede modificar el metabolismo celular de acuerdo al subtipo de receptor activado y al metabolismo de cada tipo celular en particular. Las primeras evidencias de la existencia de estos receptores provienen del año 1970 (Sattin y Rall, 1970) cuando se observó que la acumulación de AMPc mediada por adenosina en cerebro era antagonizada en presencia de metilxantinas. Cuando se descubrió que distintos compuestos derivados de la adenosina eran capaces de incrementar o disminuir la cantidad de AMPc intracelular se propuso que la adenosina interactuaba con dos tipos de receptores, los que inhibían la adenilato ciclasa se denominaron A_1 (van Calker y col., 1979) y los que la estimulaban A_2 (Londos y col., 1980).

Posteriormente, gracias a técnicas de biología molecular y farmacológicas, han sido definidos y caracterizados cuatro clases de receptores de adenosina, todos ellos acoplados a proteínas G, incluidos dentro de la familia A de GPCR. Los receptores del tipo 2 se subdividieron en receptores de alta afinidad, A_{2A} , y receptores de baja afinidad, A_{2B} (Burns y col., 1986). En 1992 se clonó y caracterizó el último de los receptores de la familia, denominado A_3 (Zhou y col., 1992), el cual se observó que también estaba acoplado de forma inhibitoria a la adenilato ciclasa. Los receptores A_1 , A_{2A} y A_{2B} presentan una elevada homología de secuencia entre las distintas especies en las que han sido clonados sin embargo, no ocurre lo mismo con el receptor A_3 , el cual presenta diferencias considerables entre especies.

De los cuatro receptores de adenosina, el receptor A_1 es el más abundante y el más ampliamente distribuido en cerebro (Fastbom y col., 1987), mientras que los A_{2A} se encuentran concentrados en los ganglios basales aunque están presentes en todo el cerebro a una densidad menor (revisado en Fredholm y col., 2003).

Existe bastante información acerca de la distribución de los receptores A_1 y A_{2A} de diferentes especies obtenida mediante el empleo de radioligandos y anticuerpos específicos (revisado por [Ribeiro y col., 2002](#)). En general, la localización de ambos receptores en SNC es predominantemente sináptica, siendo a nivel postsináptico más densos los receptores A_1 que los A_{2A} , a excepción del estriado, donde los receptores A_{2A} son mucho más densos a nivel postsináptico que los A_1 . Además de esta localización neuronal, ambos receptores también se encuentran en astrocitos y microglía, los A_1 en oligodendrocitos y los A_{2A} en los vasos sanguíneos. Debido a su poca abundancia en cerebro el papel de los receptores A_{2B} y A_3 ha recibido menos atención. A este hecho han contribuido la falta de herramientas farmacológicas potentes y selectivas, lo que ha hecho a estos receptores mucho menos estudiados y, por tanto, comprendidos que los receptores A_1 y A_{2A} . La capacidad de los receptores de adenosina para regular las diversas funciones biológicas en las que están implicados está estrechamente relacionada con la concentración extracelular de adenosina. Los receptores A_1 y los A_{2A} son los más afines por su ligando, mientras que los receptores A_{2B} y A_3 presentan una afinidad menor por la adenosina, por lo que el papel de estos receptores cobraría importancia en situaciones de estrés fisiológico o patológicas en las que la concentración de adenosina aumente enormemente (revisado por [Fredholm, 2007](#) y [Gessi y col., 2008](#))

Los receptores de adenosina fueron inicialmente clasificados en función de su capacidad para inhibir o estimular la actividad adenilato ciclasa, como ya se ha comentado anteriormente. Sin embargo, en la actualidad hay autores que cuestionan esta clasificación ya que, todos los receptores de adenosina han demostrado su capacidad para acoplarse a distintos sistemas de proteínas G y a diferentes sistemas de transducción en diferentes tipos celulares. Por ello, lo que estos autores proponen es que estos receptores presentan efectos pleiotrópicos, es decir, potencialmente pueden acoplarse a diferentes sistemas de transducción, ello depende de su grado de activación y de la localización subcelular en cuestión (revisado por [Cunha, 2005](#)).

Tras la activación de las proteínas G correspondientes, los receptores de adenosina también modulan la actividad de varios canales iónicos, como es posible predecir en función de las características comentadas de las proteínas G heterotriméricas. Así, el receptor A_1 media la inhibición de la adenilato ciclasa, inhibe varios canales de potasio ([Li y Henry, 1992](#)), inhibe canales de calcio de tipo N, P y Q, activa la fosfolipasa $C\beta$ y activa la vía de las MAP quinasas a través de ERK1/2, vía subunidades $\beta\gamma$ ([Dickenson y col., 1998](#)). No obstante, el principal efecto fisiológico mediado por este receptor, la inhibición pre-sináptica de la liberación de glutamato, parece no estar relacionado con la capacidad de este receptor de modular los niveles de AMPc sino más bien con la inhibición de la entrada de calcio ([Cunha, 2001](#)). Por otro lado, la inhibición de la actividad neuronal mediada por el receptor A_1 tiene un componente adicional a nivel postsináptico, donde la activación de los receptores A_1 inhibe la conductancia de potasio, lo que produce la hiperpolarización neuronal (revisado en [Greene y Haas, 1991](#)), efecto importante a la hora de controlar la activación neuronal a elevadas frecuencias de estimulación ([Thompson y col., 1992](#)).

Esta pleiotropía no es característica únicamente del receptor A_1 . En el caso del receptor A_{2A} , el cual se asume que está acoplado de manera estimuladora a la adenilato ciclasa a través de una G_s (o una G_{olf}) aumentando los niveles de AMPc, varios grupos han demostrado que estos receptores controlan la liberación

de la mayoría de los neurotransmisores (glutamato, GABA, glicina, acetilcolina, noradrenalina, serotonina) de forma independiente de los niveles de AMPc pero dependiente de la activación de la PKC, al estimular canales de calcio dependientes de voltaje (Cunha y Ribeiro, 2000).

En resumen, en relación a los dos principales receptores de adenosina del cerebro, la acción fisiológica de ambos parece ser opuesta en lo que al control de la liberación de neurotransmisores se refiere. En particular, en sinapsis glutamatergicas se ha observado que estos receptores colocan en el hipocampo (Rebola y col., 2005b) y existe una relación funcional entre los mismos con efectos opuestos sobre la liberación de glutamato (Lopes y col., 1999b). Por otro lado, dado el hecho de que la afinidad de ambos receptores por la adenosina sea similar, encontrándose en el rango del nanomolar bajo, es posible asumir que deben existir diferentes mecanismos por los que se genere adenosina en un tejido que permitan activar un receptor u otro, ya que ambos presentan acciones opuestas sobre liberación de neurotransmisores (revisado en Cunha, 2005).

Además de los efectos descritos sobre el control de la actividad neuronal, la adenosina ejerce otros efectos en células del SNC que también pueden influenciar la actividad neuronal. Por ejemplo, los astrocitos expresan los cuatro subtipos de receptores de adenosina (revisado por Ciccurelli y col., 2001) que controlan su actividad y la liberación de sustancias que puedan influenciar la actividad neuronal (Schwaninger y col., 1997; Brodie y col., 1998). Por su parte la adenosina también controla la reactividad de la microglía (Wollmer y col., 2001), pudiendo estar implicada en el control de la neuro-inflamación (Schubert y col., 1996). Por todo, ello la adenosina puede tener una influencia muy activa en la comunicación glía-neurona, como se trata de representar en la siguiente Ilustración.

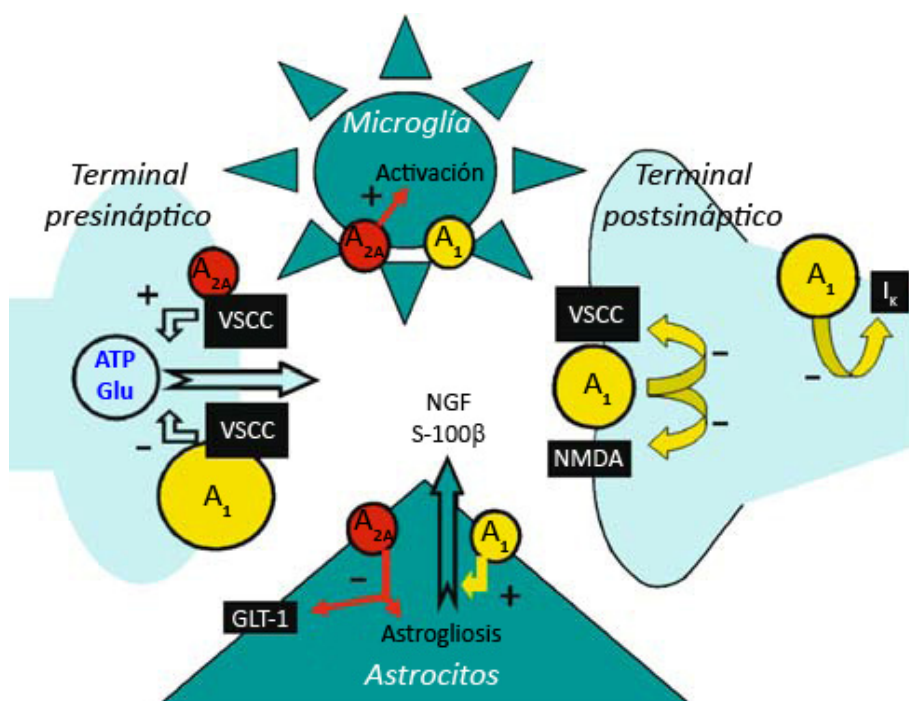


Ilustración 12: Comunicación neurona-glía mediada por los receptores A_1 y A_{2A} . Todos los tipos y compartimentos celulares están dotados de receptores A_1 y A_{2A} en diferentes proporciones, indicadas por el tamaño relativo de los círculos, que desempeñan distintos papeles en función de su localización, como se ha comentado en el texto. Abreviaturas: I_K , conductancia para potasio; GLT-1, transportador de glutamato; VSCC, canales de calcio sensibles a voltaje (del inglés, Voltage Sensitive Calcium Channels). Modificado de Cunha, 2005.

No obstante, estos procesos pueden complicarse todavía más ya que la idea tradicional de los receptores como entes aislados y funcionando como sistemas de señalización independientes no se corresponde con los hallazgos realizados en el campo de la biología molecular, en los que ha quedado demostrado que los receptores de adenosina pueden funcionar como homo (Ciruela y col., 1997) o hetero-dímeros, bien junto con otros receptores purinérgicos (Yoshioka y col., 2002) o bien junto a receptores de otras familias, como los metabotrópicos de glutamato (Ciruela y col., 2001; Nishi y col., 2003), lo que amplía enormemente el posible impacto de la adenosina en la función cerebral. Por otro lado, la activación de estos receptores conlleva, como para todos los GPCR, procesos de desensibilización característicos que dan lugar a las vías de señalización mediadas por arrestinas (Klaasse y col., 2008).

Finalmente, cabe destacar la capacidad conocida de los receptores de adenosina de producir cambios en el ciclo celular. Se ha demostrado que A_{1} , A_{2A} , A_{2B} y A_{3} pueden activar ERK1/2 (Schulte y Fredholm, 2000), aunque en el caso de A_{2A} depende del trasfondo celular (revisado por Fredholm y col., 2007). Por su parte, se ha demostrado que A_{2B} , además de activar la ruta de las MAP, es capaz de activar JNK y p38 (Feoktistov y col., 1999).

1.3.2. Papel fisiológico de la adenosina: fenotipos de los ratones Knock-out.

En el apartado anterior se comentaron las principales funciones de la adenosina, actuando a través de sus receptores en el SNC. No obstante, como se ha comentado la adenosina se encuentra presente en todas las células del organismo, por lo que el número de funciones fisiológicas en las que se encuentra implicada es mayor que las observadas para cualquier neuromodulador. En este apartado se describirán brevemente otras funciones desempeñadas por la adenosina observadas a partir del estudio de animales deficientes en alguno de sus receptores, que se completarán con la Tabla 2, que muestra las principales funciones reconocidas para los distintos receptores de adenosina.

Dada la abundante expresión del receptor A_{1} en cerebro era de esperar que la deficiencia en este gen proporcionara un fenotipo bastante diferente del salvaje. En este sentido, se ha observado que los ratones deficientes para el receptor A_{1} (Johansson y col., 2001; Giménez-Llort y col., 2002) presentan una marcada ansiedad, un comportamiento agresivo y la respuesta a hipoxia está sustancialmente alterada, reduciendo la viabilidad de los mismos ante estos procesos. Por otro lado, estos ratones son normales en la mayoría de los aspectos (viabilidad, fertilidad, peso, temperatura, reflejos motores, memoria). El estudio de estos ratones también permitió definir el papel analgésico de la adenosina, ya que se observó que los ratones *KO* para el receptor A_{1} eran más sensibles al dolor sin presentar una sensibilidad ante una estimulación mecánica mayor. Estos resultados demuestran que el papel del receptor A_{1} no es esencial en el desarrollo del organismo pero que desempeña un papel importante en condiciones patológicas, como la hipoxia, y pudiera estar relacionado con otras condiciones patológicas o con el desarrollo de analgésicos. En el caso particular de la hipoxia se observó que el efecto de la eliminación del receptor A_{1} era dependiente de la edad, observándose que los animales adultos sobrevivían menos a procesos hipóxicos en ausencia del receptor A_{1} , pero que los neonatos

salvajes eran más sensibles a la ausencia de oxígeno que los *KO* (Turner y col., 2004). No obstante, estos ratones presentan una vida media más corta, debida quizá a disfunciones cardiovasculares, renales o hepáticas, donde los receptores A_1 desempeñan un papel importante.

Los ratones *KO* para el A_{2A} se consiguieron en 1997 por el mismo laboratorio que clonó primero los receptores de adenosina (Ledent y col., 1997), aunque otros animales se construyeron posteriormente (Chen y col., 1999). Su estudio demuestra que estos animales presentan una presión sanguínea elevada y mayores niveles de agregación plaquetaria, aunque son viables y se alimentan con normalidad. Por otro lado los A_{2A} son también importantes para los efectos estimulantes de la cafeína a nivel motor, observándose que en estos animales el efecto de la cafeína era más bien el contrario, una depresión de la actividad motora (Yang y col., 2009). Por otro lado, los machos deficientes en este receptor presentaban un carácter más agresivo que pudiera estar relacionado con la ansiedad e irritabilidad descrita en humanos por consumo crónico de cafeína (Fredholm y col., 1999). Al igual que los *KO* para los receptores A_1 , los ratones deficientes en A_{2A} soportaban mejor el dolor según varios tests (Berrendero y col., 2003). Por último, el estudio de estos animales se ha relacionado con procesos patológicos. Se ha demostrado que la activación de estos receptores contribuye al daño cerebral producido en procesos isquémicos y que el empleo de antagonistas de estos receptores puede resultar una herramienta válida para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson así como para el desarrollo de agentes antidepresivos efectivos, mientras que el uso de agonistas puede resultar interesante como droga antipsicótica. En el caso de la hipoxia, estos ratones muestran efectos opuestos a los observados en los *KO* del receptor A_1 , desempeñando el receptor A_{2A} un importante papel protector en la hipoxia cerebral neonatal. Un dato curioso surgió del posible empleo de antagonistas del receptor A_{2A} como drogas útiles en los procesos de abstinencia por alcohol (El Yacoubi y col., 2003), a pesar de que los ratones *KO* consumían más etanol que los salvajes (Naasila y col., 2002).

Mientras que el papel de los receptores A_1 y A_{2A} está bastante establecido en cerebro, los receptores A_{2B} y A_3 han sido relacionados más fácilmente con sus funciones en órganos periféricos, principalmente por la falta de ligandos específicos y la baja densidad de estos receptores en cerebro. El *KO* para el receptor A_{2B} ha sido construido recientemente (Yang y col., 2006), no obstante su estudio se ha centrado en órganos periféricos, donde parece desempeñar funciones más importantes que en SNC, como son la protección frente a la inflamación y la excesiva adhesión celular (Xu y col., 2008).

Ratones *KO* para el receptor A_3 presentan una disminución en la permeabilidad vascular (Tilley y col., 2000) y una mayor respuesta al tratamiento con adenosina en corazón y aorta (Zhao y col., 2000), aunque debido a las diferencias farmacológicas y de distribución entre ratones y humanos no está claro que el resultado sea por completo extrapolable. Por otro lado, estos ratones presentan una menor sensibilidad frente a algunos tipos de dolor, una elevada actividad motora sin signos de ansiedad y una mayor neurodegeneración en procesos de hipoxia (Fedorova y col., 2003). Por todo ello, a pesar de la baja expresión de los receptores A_3 en cerebro, los efectos observados en estos ratones señalan que estos receptores desempeñan un papel complejo en el control del temperamento e incluso pudieran estar relacionados con el desarrollo del individuo (Björklund y col., 2008).

Subtipo	Acoplamiento a proteínas G	Agonistas Selectivos	Antagonistas selectivos	Principales funciones fisiológicas
A ₁	G _i	CPA		Bradycardia, inhibición de la lipólisis, reducción de la filtración glomerular, retroalimentación tuberoglomerular, antinocicepción,
	G _o	CHA	DPCPX	reducción de la actividad simpática y parasimpática, inhibición presináptica, hiperpolarización postsináptica, preconditionamiento
		R-PIA		isquémico
A _{2A}	G _s	CGS 21680		Regulación sensomotora en ganglios basales, inhibición de la agregación de plaquetas y de leucocitos polimorfonucleares,
	G _{oif}	HE-NECA	ZM241385	vasodilatación, protección frente al daño isquémico, estimulación de la actividad nerviosa
A _{2B}	G _s	-	PSB 1115	Relajación del músculo liso en la vasculatura e intestino, inhibición de la función de monocitos y macrófagos, estimulación de
	G _{q/11}			mastocitos (algunas especies)
A ₃	G _i	2-Cl-IB-MECA	MRS 1220	Estimulación de mastocitos (algunas especies),
	G _{q/11}			preconditionamiento (algunas especies)

Tabla 2: Resumen del acoplamiento a proteínas G, farmacología y principales funciones fisiológicas de los receptores de adenosina.

Adaptado de [Fredholm y col., 2005a](#).

I.4. Neurodegeneración: Procesos de muerte neuronal.

Las neuronas de los mamíferos están entre los tipos celulares de vida más larga del organismo. A pesar del descubrimiento reciente de que las células madre neuronales pueden proliferar en el cerebro adulto (revisado en [Abrous y col., 2005](#)), se ha aceptado como dogma que la mayoría de neuronas del SNC perduran durante toda la vida del organismo. No obstante, las neuronas no son invulnerables y durante el propio desarrollo embrionario, el sistema nervioso se remodela eliminando el exceso de neuronas asegurando un correcto desarrollo. Se trata de una muerte programada imprescindible para una adecuada formación del sistema nervioso. Además de este proceso fisiológico, las neuronas también pueden morir de forma prematura en cualquier momento de la vida del individuo cuando se producen situaciones neurotóxicas agudas o crónicas (revisado en [Yuan y col., 2003](#)).

En un estudio clásico de muerte celular durante el desarrollo embrionario ([Schweichel y Merker, 1973](#)) se clasificaron los tipos de muerte celular en tres categorías basadas en diferencias morfológicas y estructurales: apoptosis ([Kerr y col., 1972](#); revisado por [Danial y Korsmeyer, 2004](#)), autofagia y necrosis (revisado por [Edinger y, Thompson, 2004](#)). Aunque la apoptosis y la necrosis han sido contempladas normalmente como dos tipos de muerte distintas, cada vez hay más evidencias de que en realidad representan los dos extremos de un amplio rango de tipos de muerte celular clasificadas en función de sus características morfológicas y bioquímicas. De hecho, no siempre se cumplen todos los requisitos que permiten caracterizar un determinado proceso de muerte e incluso un mismo estímulo puede inducir un tipo de muerte u otro en

función de su intensidad, la subpoblación neuronal implicada, la especie, la edad o el genotipo del organismo en cuestión. La Ilustración 13 expone un resumen de las rutas caracterizadas de supervivencia y muerte neuronal.

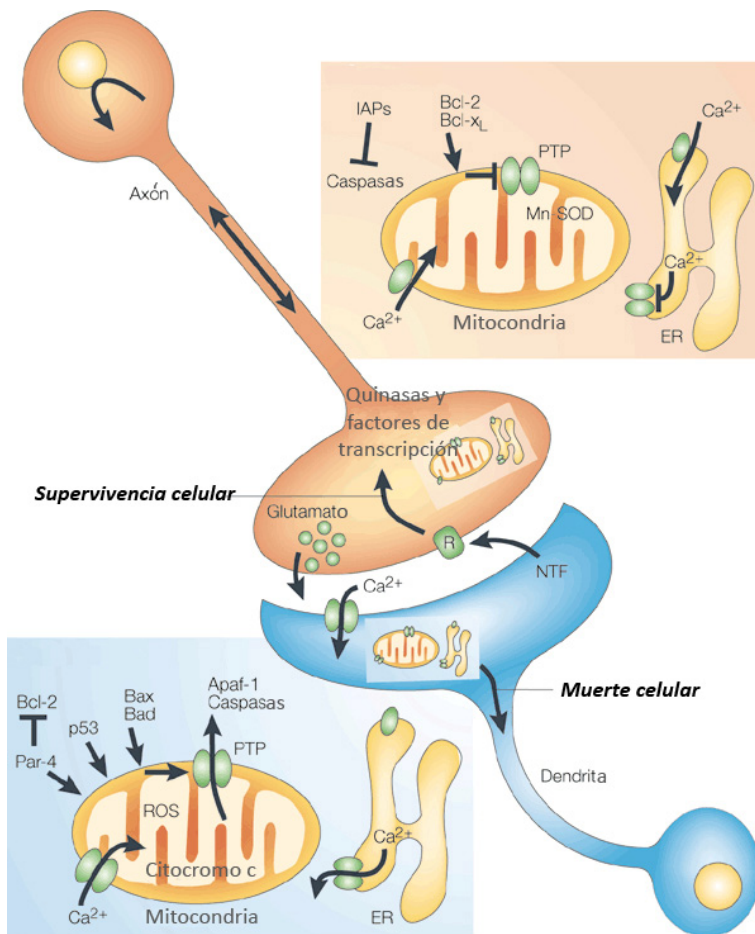


Ilustración 13: Rutas descritas de supervivencia y muerte celular. Un ejemplo de activación de rutas de supervivencia es el descrito para la activación de receptores para factores neurotróficos (NTF), en las cuales se activan cascadas de señalización y factores de transcripción que incrementan la producción de proteínas implicadas en supervivencia o anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-X_L, etc). Las rutas de muerte celular pueden activarse por la liberación masiva de glutamato. En este caso, la sobreactivación de receptores produce la entrada masiva de calcio, que puede inducir la activación de proteínas pro-apoptóticas, como PAR-4, BAD, BAX y p53, las cuales acaban liberando citocromo c quedando activada la ruta de las caspasas. Adaptado de Mattson, 2000.

En este apartado se expondrán las principales características de los agentes tóxicos empleados en la parte experimental de la presente *Memoria*.

I.4.1. Excitotoxicidad.

Históricamente, el descubrimiento de la capacidad neurotóxica del glutamato data de finales de los 50. Lucas y Newhouse encontraron que al inyectar L-glutamato en ratones en desarrollo se destruían las capas neurales internas de la retina (Lucas y Newhouse, 1957). Seguidamente fue Jonh Olney el que confirmó esta retinotoxicidad y, tras el estudio del proceso a nivel celular, acuñó el término excitotoxicidad para dar nombre a la neurodegeneración producida por aminoácidos excitadores (Olney, 1969). Ya se ha comentado que el glutamato ejerce sus efectos a través de los receptores de glutamato, por tanto, su liberación masiva produce la estimulación rápida de los receptores ionotrópicos de glutamato postsinápticos, permitiendo el flujo descontrolado de iones Na^+ y Ca^{2+} al interior celular (revisado en Coyle y Puttfarcken, 1993). En general, se ha propuesto que el calcio que entra a través de los receptores NMDA es especialmente letal, debido a la

co-localización de estos canales con proteínas celulares especialmente sensibles, por lo que se han desarrollado un número más elevado de trabajos relacionados con la excitotoxicidad en estos receptores ionotrópicos que en el resto. No obstante, el desarrollo de fármacos clínicos para el infarto cerebral basados en el bloqueo de los receptores ionotrópicos no ha proporcionado resultados satisfactorios (Muir y Lees, 1995), a pesar de los buenos resultados obtenidos en modelos experimentales.

En cualquier caso, un mediador clave de este proceso de muerte celular es el ión Ca^{2+} , el cual está implicado en multitud de procesos celulares como crecimiento celular, diferenciación y actividad sináptica. Se encuentra regulado, tanto espacial como temporalmente, por complejas relaciones entre su entrada, salida, almacenamiento y tamponamiento. Es esta regulación tan compleja la que permite que puedan darse diferentes procesos mediados por calcio en una misma célula. Debido a esta gran complejidad del sistema de estudio los mecanismos desencadenados por la liberación masiva de calcio no se comprenden por completo (revisado por Arundine y Tymianski, 2003). A continuación se esquematiza este proceso de forma global.

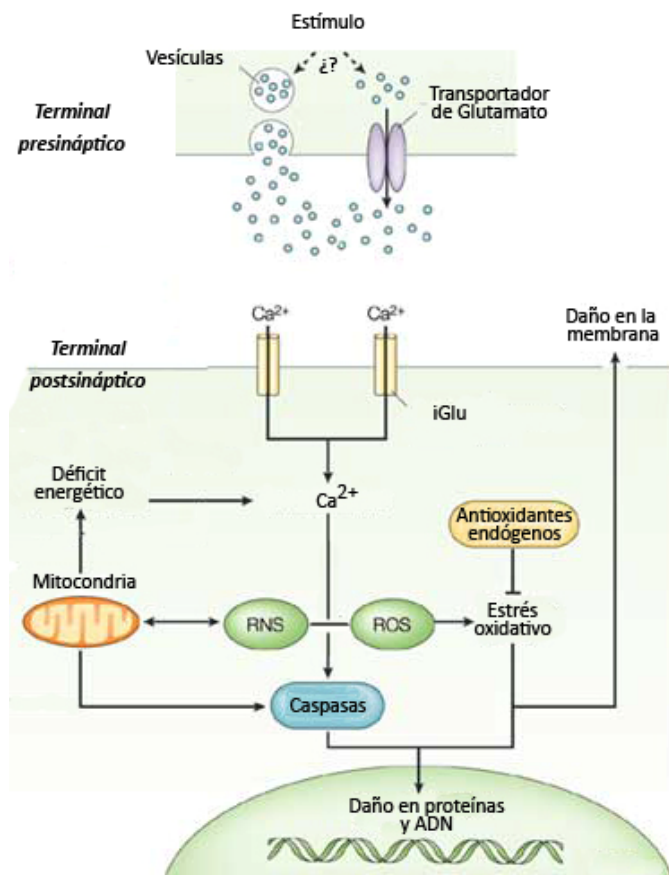


Ilustración 14: Sucesos generales que ocurren en la muerte por excitotoxicidad. Tras un estímulo desconocido se produce la liberación masiva de glutamato a la hendidura sináptica. El glutamato actúa sobre los receptores ionotrópicos produciendo la entrada masiva de calcio, el cual produce múltiples efectos como disfunción mitocondrial, déficit energético y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Al final de estos procesos se encuentran el daño celular por peroxidación lipídica, en proteínas celulares y a nivel de ADN, pudiéndose activar proteasas dependientes de calcio y la vía de las caspasas. Modificado de Lo y col., 2003.

Por otro lado, existen evidencias considerables sobre el papel de la excitotoxicidad en diversidad de trastornos neurodegenerativos agudos como el infarto cerebral, la epilepsia, lesiones de la médula espinal e hipoglucemia (revisado por Choi, 1988), así como en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, corea de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (revisado por Gardoni y Di Luca, 2006 y por Corona y col., 2007).

I.4.2. Efecto de la disponibilidad biológica de oxígeno.

En el cerebro adulto, la muerte celular puede ser debida a multitud de factores tóxicos, sin embargo, el más común de ellos es la interrupción súbita del flujo sanguíneo o isquemia. El elevado aporte de oxígeno que requiere el cerebro para mantener su metabolismo hace que éste sea un tejido especialmente sensible a los efectos de la hipoxia. Según la *American Heart Association* cada 45 segundos alguien sufre un derrame cerebral y cada 3 minutos alguien muere por esta causa sólo en Estados Unidos. Los supervivientes de esta enfermedad sufren deficiencias físicas, emocionales y cognitivas en muchos casos permanentes, lo que hace más evidente la necesidad de una descripción adecuada del daño producido en estas situaciones así como de posibles mecanismos que puedan influir en estos procesos de muerte neuronal.

A nivel molecular la hipoxia produce profundos cambios en los perfiles de expresión génica celulares. Estos efectos están gobernados por una familia de factores de transcripción altamente regulada conocida como HIF (del inglés *hypoxia-inducible factor*). Además de esta familia de factores de transcripción, otros factores y rutas celulares se activan como consecuencia de la disminución en la presión parcial de oxígeno (revisados por [Kenneth y Rocha, 2008](#)). El factor HIF es un dímero formado por una subunidad α , sensible a la disponibilidad de oxígeno, y una subunidad β , que se expresa de forma constitutiva. Se conocen varias subunidades α para el factor HIF, en mamíferos se denominan HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α . La primera se expresa de forma ubicua, pero las otras dos subunidades presentan una distribución más restringida. La activación de este factor de transcripción es un proceso en varios pasos que comprende la estabilización de la subunidad α , la translocación al núcleo, su heterodimerización y la posible interacción con otras proteínas que regulen de forma más precisa la activación transcripcional de los genes activados por hipoxia (revisado por [Brahimi-Horn y col., 2005](#)). Este proceso se esquematiza en la Ilustración siguiente.

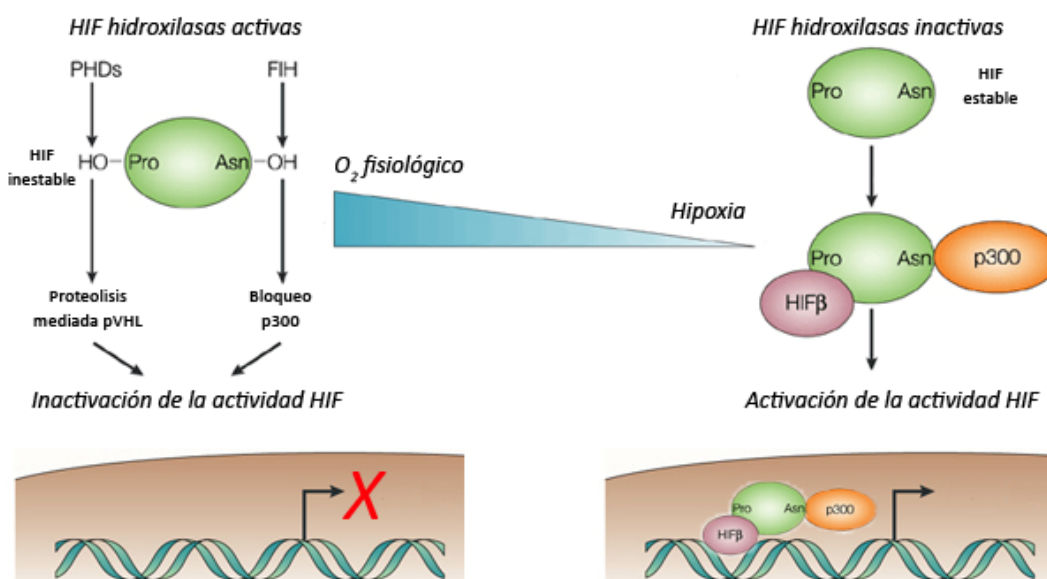


Ilustración 15: Varios sensores de oxígeno controlan la actividad de HIF-1 α . El factor HIF es un heterodímero formado por una subunidad α sensible a oxígeno y una subunidad β insensible a oxígeno. La subunidad α es susceptible de ser hidroxilada por dos sensores de oxígeno, las prolil hidroxilasas (PHD), que inducen la unión de la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (VHL) y su degradación proteosómica, y los factores inhibidores de HIF (FIH), que impiden la unión del cofactor p300 requerido para la transcripción de algunos genes diana. Durante la hipoxia estas hidroxilasas se encuentran inactivas, estos procesos se suprimen y se permite la formación de un complejo de transcripción activo. Modificado de [Dang y col., 2008](#).

Además del papel desempeñado por la hipoxia en procesos de daño cerebral, se han descrito relaciones entre la principal familia de factores de transcripción que controla los efectos de la hipoxia sobre el transcriptoma y procesos relacionados con la oncología. Por un lado, se ha descrito la interacción de los factores HIF con oncogenes, como la familia MYC. Esta interacción permite, bajo condiciones fisiológicas, una adecuación del ciclo celular frente a una situación de baja disponibilidad de oxígeno, sin embargo, en condiciones tumorales, esta interacción confiere a las células tumorales ventajas metabólicas frente a las células no transformadas (revisado por [Dang y col., 2008](#)). Por otro lado, se ha relacionado los factores HIF como principales mediadores de la neovascularización, el metabolismo de la glucosa, las supervivencia y la metástasis tumoral (revisado por [Pouysségur y col., 2006](#)). Estos nuevos descubrimientos ponen de manifiesto la importancia del estudio de los fenómenos relacionados con la hipoxia y la señalización celular subyacente.

1.4.3. El péptido amiloide y la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer se define como una enfermedad degenerativa progresiva del cerebro caracterizada por la desorientación y la pérdida de memoria, de atención y de la capacidad de raciocinio. Se considera la primera causa de demencia en la vejez, abarcando hasta el 70% de los casos. Teniendo en cuenta el envejecimiento progresivo de la población mundial el estudio de esta enfermedad está ampliamente justificado. Fue descrita por primera vez por el neuropatólogo alemán Alois Alzheimer en 1906, que publicó el caso de una mujer de 51 años cuyas facultades intelectuales habían desaparecido gradualmente en un período de 4 años (traducido en [Alzheimer y col., 1995](#)).

Los desencadenantes de esta enfermedad no están claros en la actualidad, aunque existen varias teorías al respecto. Las hipótesis existentes se basan en los dos rasgos anatomopatológicos característicos de esta enfermedad. La presencia de acumulaciones de proteínas en las neuronas y fuera de ellas es el rasgo más característico y se considera un marcador de la misma, de hecho se conoce desde 1968 que existe una correlación entre la densidad de estas acumulaciones extracelulares y la severidad de la demencia ([Blessed y col., 1968](#)). Sin embargo, no fue hasta casi 80 años después del trabajo de Alzheimer cuando se identificaron los componentes moleculares de estas acumulaciones de proteína, por un lado el péptido β -amiloide, o simplemente péptido amiloide, proveniente de la ruptura proteolítica de una proteína transmembrana, era el componente bioquímico principal de las placas neuríticas extracelulares ([Glenner y Wong, 1984](#)), mientras que la proteína tau hiperfosforilada, una proteína de unión a microtúbulos, era el componente central de los ovillos neurofibrilares intracelulares ([Grundke-Iqbal y col., 1986](#)). No obstante, se desconoce el papel exacto que tienen estas estructuras a la hora del desarrollo de la enfermedad, cuál es la causa de su aparición, si son causa o consecuencia y por qué algunos pacientes ancianos tienen neurofibrillas y no desarrollan síntomas mientras otros pacientes sí que desarrollan la enfermedad ([Shoji y col., 1992](#)).

La hipótesis más ampliamente aceptada para explicar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer es la denominada “hipótesis amiloide” (revisada por [Hardy y Selkoe, 2002](#)). Esta hipótesis establece que el aumento en la cantidad de péptido amiloide en el cerebro es el primer factor patogénico que conduce al resto de las

características histológicas y clínicas observadas en esta enfermedad, entre ellas, la hiperfosforilación de tau. En la actualidad, aunque parece claro que el péptido amiloide desempeña un papel central en el desarrollo de la enfermedad, existen evidencias de que no sólo se acumula de forma extracelular, sino que se han descrito agregados intracelulares que podrían tener diferentes efectos patológicos (revisado por [LaFerla y col., 2007](#)), que podrían ser anteriores a la acumulación de péptido amiloide extracelular ([Braak y Del Tredici, 2004](#)) e incluso que la estructura tóxica más pequeña está formada por dímeros solubles del péptido amiloide ([Shankar y col., 2008](#)). Estos nuevos descubrimientos hacen que las hipótesis de trabajo sobre la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer estén en continua revisión. Así, se ha propuesto recientemente que deficiencias en los patrones de mielinización son anteriores a la aparición de las placas y los ovillos en un modelo animal ([Desai y col., 2009](#)) o que placas y ovillos podrían ser causados por un antecedente común y ambas rutas serían igual de importantes en el desarrollo de la enfermedad (revisado por [Small y Duff, 2008](#)). En la presente *Memoria* se ha aceptado la “hipótesis amiloide”, empleándose la exposición al péptido amiloide como modelo experimental *in vitro*.

El péptido amiloide proviene de la proteína precursora de β amiloide (APP, del inglés *Amyloid Precursor Protein*), la cual sufre cortes secuenciales por varias proteasas, denominadas α , β y γ secretasas. La glicoproteína APP es ubicua y se encuentra codificada en el cromosoma 21, atraviesa la membrana y su heterogeneidad proviene de procesamiento alternativo y de modificaciones post traduccionales ([Kang y col., 1987](#)). Se conocen hasta la fecha 4 variantes por *splicing* alternativo siendo la más común de ellas la que da lugar a una proteína de 695 aminoácidos pero pudiendo alcanzar hasta 770 ([Esch y col., 1990](#)).

El procesamiento fisiológico de APP puede ocurrir por dos vías: amiloidogénica y no amiloidogénica. La ruta no amiloidogénica es la mayoritaria y excluye la formación del péptido amiloide. El primer corte de esta vía la produce una enzima denominada α -secretasa, una metaloproteasa, que corta por medio del fragmento que daría lugar al péptido amiloide, liberándose un fragmento de aproximadamente 100 kDa (sAPP) y un fragmento menor que puede sufrir cortes adicionales (C83). Por otro lado, el primer corte de la ruta amiloidogénica lo produce la β -secretasa, también llamada BACE1 (del inglés *β -site APP-Cleaving Enzyme 1*), que libera un fragmento al exterior celular (sAPP β) mientras que otro fragmento de 99 aminoácidos queda anclado en la membrana (C99). Este C99 será posteriormente cortado, por un complejo denominado γ -secretasa, entre los aminoácidos 38 y 43 para así liberar el péptido amiloide. El lugar exacto de corte es muy relevante en lo que a la capacidad de agregación del péptido resultante se refiere, siendo el corte mayoritario el que libera un fragmento de 40 aminoácidos y estando las placas neuríticas principalmente formadas por el péptido de 42 aminoácidos. En individuos sanos, la proporción de los fragmentos de 40 y 42 aminoácidos es de 10:1 respectivamente, mientras que esta proporción aumenta en condiciones patológicas (revisado por [LaFerla y col., 2007](#)).

A nivel molecular las consecuencias biológicas de la acumulación del péptido amiloide son varias. En general, se acepta que existe un balance descompensado entre la producción y la eliminación del péptido amiloide, el cual presenta tendencia a agregarse formando placas insolubles, que conduce gradualmente a un deterioro sináptico con activación glial, siendo la acumulación de este péptido responsable del deterioro cognitivo

observado ([Hardy y Selkoe, 2002](#)). Sin embargo, los procesos que llevan de la acumulación del péptido amiloide al deterioro neuronal no están todavía claros, aunque se resumen en la generación de especies reactivas de oxígeno, alteraciones mitocondriales y la desregulación de la homeostasia del calcio (revisado por [Mattson, 2004](#)). Por los estudios realizados en modelos experimentales se deduce que la acumulación del péptido amiloide genera estrés oxidativo ([Nunomura y col., 2001](#)), el cual afecta al calcio neuronal, haciendo a las neuronas más sensibles a los fenómenos de excitotoxicidad y al desarrollo de alteraciones en el citoesqueleto (revisado por [Bezprozvanny y Mattson, 2008](#)). La hiperfosforilación de la proteína tau inhibe el correcto ensamblaje de los microtúbulos, produciendo en última instancia la degeneración de la neurona afectada (revisado por [Iqbal y Grundke-Iqbal, 2006](#)). Por otro lado, la acumulación del péptido amiloide produce la activación glial antes descrita, que resulta en una respuesta inflamatoria descontrolada con efectos neurodegenerativos (revisado por [Dhawan y col., 2008](#)).

En lo que respecta a la acumulación del péptido amiloide, se ha demostrado que las mutaciones que conducen a un mayor procesamiento amiloidogénico de la proteína APP dan lugar a una forma de esta enfermedad denominada hereditaria o familiar que comprende entre el 1 y el 5% del total de casos detectados en humanos. No obstante, a nivel de tejido los efectos de la variante esporádica de la enfermedad son indistinguibles de los de la hereditaria, por lo que la mayoría de los modelos empleados para el estudio de mecanismos y desarrollo de terapias están basados en la introducción en el animal de laboratorio de una mutación que conlleve el aumento de la acumulación del péptido amiloide. En la Ilustración 17 se exponen las principales acciones neurotóxicas descritas para el péptido amiloide.

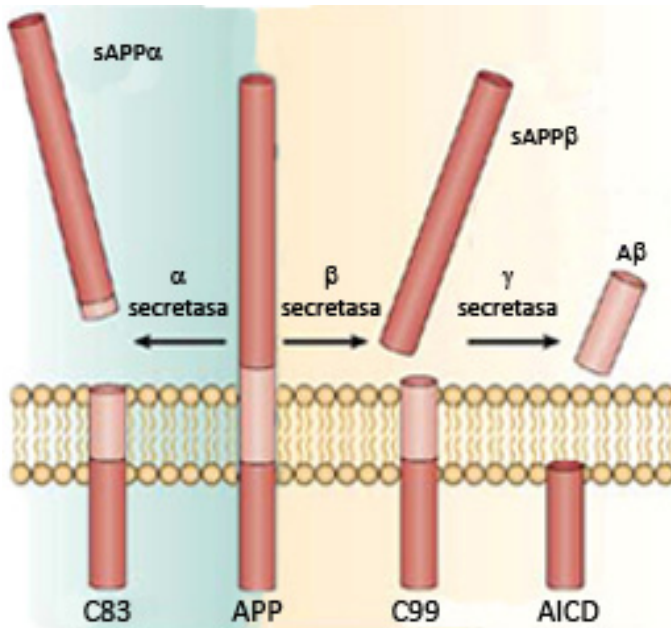


Ilustración 16: Procesamiento de la proteína APP y eventos claves en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Panel Izquierdo. La proteína precursora del péptido amiloide puede sufrir un procesamiento amiloidogénico o no amiloidogénico, siendo este último el que da lugar a la liberación del péptido amiloide. Modificado de [LaFerla y col., 2007](#). Panel Inferior. El péptido amiloide formado intra y extracelularmente oligomeriza formando placas insolubles. Oligómeros solubles pueden interferir con la actividad sináptica, mientras que las placas neuríticas producen disfunciones en las neuronas vecinas. Entre ellas, la hiperfosforilación de la proteína tau, que forma ovillos intracelulares. Microglía activada y astrocitos reactivos pueden participar en la respuesta inflamatoria local contribuyendo a la neurotoxicidad. Modificado de [Selkoe, 2004](#).

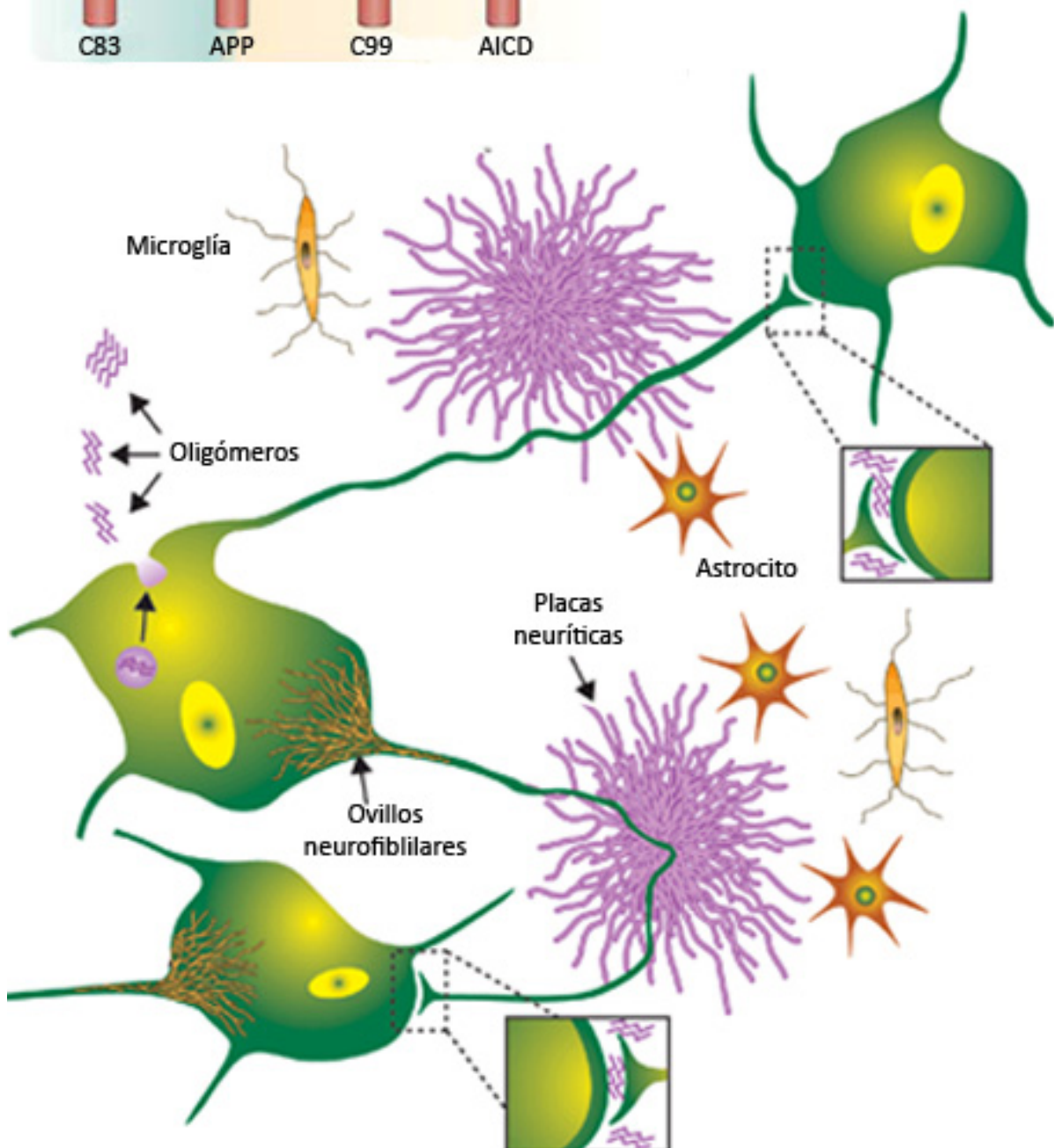
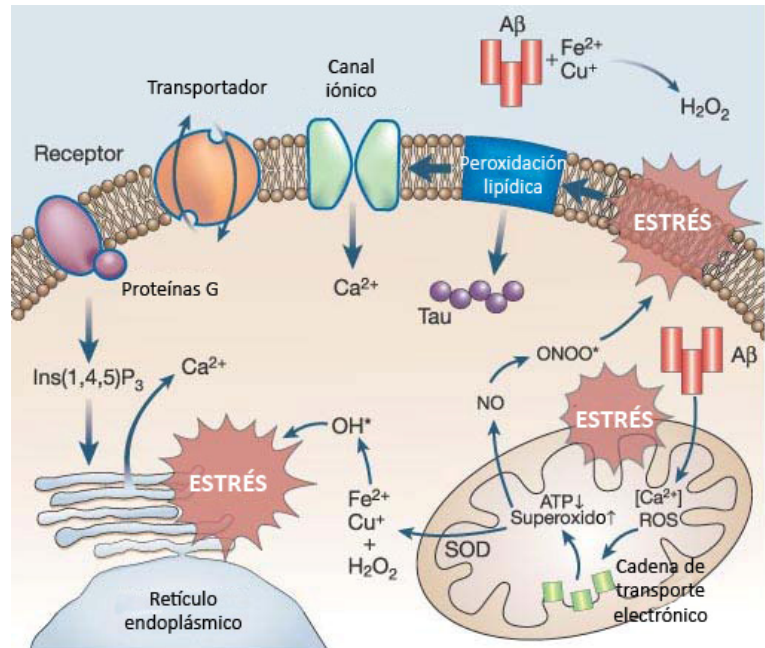


Ilustración 17: Neurotoxicidad inducida por el péptido amiloide. La interacción del péptido amiloide con iones metálicos genera agua oxigenada. El estrés oxidativo asociado a la membrana plasmática produce peroxidación lipídica y oxidación de proteínas. Algunas de las proteínas modificadas son transportadores de membrana, receptores, proteínas G o canales iónicos, que resultan desreguladas. Esta desregulación produce la activación de quinasas capaces de hiperfosforilar a la proteína tau, dando lugar a los ovillos neurofibrilares. El péptido amiloide también produce estrés oxidativo a nivel mitocondrial, lo que genera disfunciones a nivel metabólico y en la regulación de la homeostasia del calcio, lo que a su vez produce más radicales libres. Adaptado de [Mattson, 2004](#).



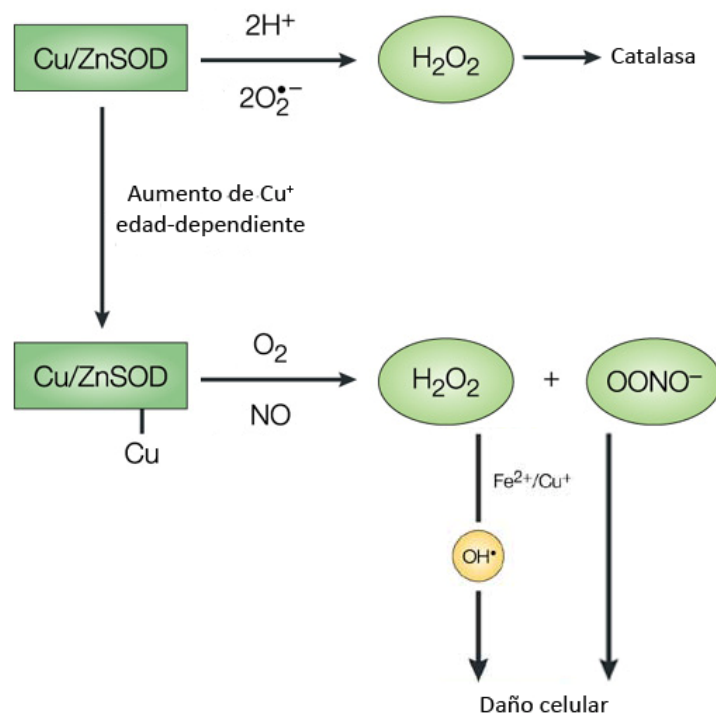
1.4.4. Efectos del estrés oxidativo.

El estrés oxidativo puede desencadenar procesos de muerte celular, generalmente apoptótica, por varios mecanismos, debidos principalmente a que las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) producen modificaciones oxidativas que afectan a proteínas, ADN, lípidos de membrana y otras moléculas. El estudio de los efectos de los radicales libres sobre las células del SNC resulta interesante ya que se ha postulado que la pérdida de funciones fisiológicas con la edad puede estar relacionada con la acumulación progresiva de daño oxidativo que, en última instancia, puede determinar el periodo de vida de un organismo. Esta teoría se formuló inicialmente en 1956 ([Harman, 1956](#)), aunque se ha reformulado varias veces hasta dar lugar a la teoría mitocondrial del envejecimiento (revisada por [Jang y Remmen, 2009](#)). Por otro lado, se ha demostrado un incremento del daño oxidativo producido con la edad en varios tejidos tanto en humanos como en varios modelos experimentales (revisado por [Muller y col., 2007](#)), lo que podría estar relacionado con el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas (revisado por [Barnham y col., 2004](#)).

La formación de radicales libres con capacidad oxidativa se produce principalmente en la mitocondria, en concreto, los complejos I y III de la cadena respiratoria son las principales fuentes del anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) ([Jezek y Hlavatá, 2005](#)). Sin embargo, este orgánulo también posee un complejo sistema de defensa antioxidativa ([Yu, 1994](#)) formado por enzimas que rápidamente transforman los radicales libres en especies químicas no tóxicas. Si el balance entre la formación de radicales libres y la eliminación de los mismos por estas enzimas antioxidantes se encuentra desplazado hacia el primer término la acumulación de daño oxidativo puede desencadenar la muerte celular. Entre las enzimas encargadas de eliminar estos radicales libres se encuentran la familia de las superóxido dismutasas (SOD), que transforman el superóxido en H_2O_2 , la catalasa,

que transforma el agua oxigenada en agua, y otras enzimas como la glutatión reductasa o hemo oxigenasa-1 cuya expresión se induce por ROS. Un factor a tener en cuenta al estudiar el balance entre los ROS formados y los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante es que algunas de las enzimas de este sistema pueden cambiar su función antioxidante por oxidante, debido principalmente al incremento de iones de hierro y cobre que se produce en cerebro con la edad (revisado por [Barnham y col., 2004](#)). De esta forma se produce una generación masiva de especies ROS relacionadas con la muerte celular por estrés oxidativo y, por tanto, con enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer ([De Leo y col., 1998](#)) y la esclerosis lateral amiotrófica ([Bergeron y col., 1994](#)). En la siguiente ilustración se intenta esquematizar estas reacciones que ocurren con la edad (revisado por [Zhu y col., 2007](#)).

Ilustración 18: Generación anómala de ROS. Son varias las reacciones por las que se pueden formar ROS de forma anómala. La función normal de la SOD es convertir radicales superóxido en agua oxigenada que es, posteriormente, inactivada por la catalasa. Debido a incrementos de cobre y/o hierro la actividad enzimática de la SOD se altera produciéndose peroxinitrito (OONO^-). El exceso de cobre y/o hierro cataliza la transformación del agua oxigenada en radicales hidroxilo (OH^\bullet). Modificado de [Barnham y col., 2004](#).



Existen varios mecanismos por los que los radicales libres pueden desencadenar procesos de muerte celular. Uno de los más comunes es que los radicales libres que se generan en la mitocondria, como consecuencia de la respiración oxidativa, pueden inducir la entrada de calcio en la mitocondria y variar su permeabilidad, produciéndose la liberación de citocromo C que inicia la cascada de apoptosis ([Mattson y Kroemer, 2003](#)). Otros procesos engloban la oxidación del ADN, la oxidación de lípidos de la membrana plasmática, relacionada ésta con pacientes de esclerosis lateral amiotrófica ([Pedersen y col., 1998](#)) y la activación de esfingomielinasas con la subsiguiente liberación de ceramida, que relaciona el estrés oxidativo con las enfermedades de Alzheimer ([Cutler y col., 2004](#)), demencia inducida por VIH ([Haughey y col., 2004](#)) y esclerosis lateral amiotrófica ([Cutler y col., 2002](#)). Además se cree que el primer evento patológico que ocurre en la enfermedad de Alzheimer es la aparición de daño oxidativo por ROS ([Nunomura y col., 2001](#)), lo que añade más valor al estudio de este proceso tan complejo.

I.4.5. Envejecimiento y muerte celular.

Las células de todas las regiones del sistema nervioso se ven afectadas por el envejecimiento, como se aprecia por un declive de las funciones sensoriales, motoras y cognitivas que se acentúa con la edad ([Hofer y col., 2003](#)). El problema del envejecimiento resulta de gran importancia si se tiene en cuenta que se estima que para el año 2050 aproximadamente el 30% de la población mundial se encontrará en torno a los 65 años de edad (el autor de la presente *Memoria* cumplirá 69 ese año) y existe un incremento sustancial en la probabilidad de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa durante la sexta, séptima y octava década de vida, lo que acarreará un elevado coste económico y social. En concreto, se ha estimado que existe una elevada probabilidad de que una persona de 85 años sufra de Alzheimer. El Parkinson, no obstante, es más común desarrollarlo a los 70 y la probabilidad de padecer esclerosis lateral amiotrófica aumenta alrededor de los 40 años (revisado por [Mattson y Magnus, 2006](#)).

Los ratones SAM (SAM, del inglés *Senescence-Accelerated Mouse*) fueron originados a partir de ratones AKR/J con la particularidad de que no se trata de un modelo manipulado genéticamente. El modelo se estableció a partir de la observación empírica de que algunas camadas presentaban rasgos característicos de una edad más avanzada de la que les correspondía. Se establecieron las 5 subcepas más sensibles al envejecimiento (SAMP, *prone*) y las 3 subcepas más resistentes o de envejecimiento normal (SAMR, *resistant*) ([Takeda y col., 1981](#)), aunque en la actualidad el modelo se ha ampliado a 9 subcepas SAMP ([Takeda, 2009](#)). De todas estas subcepas es particularmente interesante el estudio de los ratones SAMP8 ([Fujibayashi y col., 1994](#)), los cuales desarrollan de forma espontánea un fenotipo patológico caracterizado por un deterioro en el comportamiento relacionado con la edad, tal como déficits en el aprendizaje y memoria, desórdenes emocionales, como una reducida ansiedad y un comportamiento depresivo, y un ritmo circadiano alterado ([Takeda, 2009](#)). Se diferencian principalmente de otros modelos de envejecimiento en que estos ratones no son transgénicos, como los modelos de envejecimiento basados en la eliminación de p53 ([Tyner y col., 2002](#)) u otros genes (revisado por [Bartke, 2008](#)), sino que las deficiencias que se han observado en ellos aparecen de forma espontánea con la edad.

Los ratones de envejecimiento acelerado han sido un modelo empleado para el estudio de los mecanismos fundamentales que convergen en los déficits de memoria y aprendizaje desarrollados con la edad (revisado por [Butterfield y Poon, 2005](#)), aunque también han sido empleados como organismo modelo para el estudio de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (revisado por [Pallàs y col., 2008](#)).

Como modelo de envejecimiento, los ratones SAMP8 presentan las principales deficiencias cognitivas descritas con la edad en humanos, como pueden ser una deficiencia progresiva en la capacidad de atención ([McDowd y Craik, 1988](#)) así como de la memoria espacial ([Otha y col., 1981](#)). Además, las deficiencias cognitivas observadas en este modelo son abundantes y mimetizan los déficits en comportamiento y cognitivos observados en pacientes de Alzheimer y en otros modelos transgénicos. Por otro lado, este modelo reproduce con la edad y con una cronología similar a la que aparece en la patología en humanos (revisado por [Braak y Braak, 1998](#)) los principales síntomas y características histopatológicas que aparecen a lo largo de la

enfermedad de Alzheimer, como son el estrés oxidativo, gliosis, acumulación del péptido amiloide e hiperfosforilación de tau ([Pallàs y col., 2008](#)).

Es evidente que el envejecimiento está fuertemente relacionado con determinadas enfermedades neurodegenerativas, sin embargo se plantean algunos interrogantes a los que no es posible contestar en la actualidad, como, por ejemplo, el hecho de que ciertas poblaciones de neuronas se vean más afectadas que otras en determinadas enfermedades neurológicas o, en un plano más general, porqué una enfermedad neurodegenerativa causada por la edad es histopatológicamente indistinguible de la misma enfermedad causada por causas genéticas. Por otro lado, si el envejecimiento está relacionado con las enfermedades neurodegenerativas es de esperar que la ralentización de este proceso pudiera evitar de alguna manera el desarrollo de estas enfermedades. Toda esta serie de interrogantes hacen que siga siendo necesario el estudio de los mecanismos relacionados con el envejecimiento, la relación de éstos con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas para estas enfermedades.

OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo de investigación fue el estudio de la modulación de los receptores metabotrópicos de glutamato y de adenosina tanto en cultivos primarios de neuronas, como en una línea transformada, la línea C6 proveniente de astrocitoma de rata, en varios modelos de toxicidad y muerte celular relacionados directamente con patologías neurodegenerativas. Los objetivos básicos que se marcaron al comienzo de este trabajo fueron los siguientes:

1. La caracterización de los receptores de adenosina en las células C6 de glioma de rata.
2. Efecto de la toxicidad inducida por glutamato sobre los receptores objeto de estudio.
3. Efecto de la hipoxia moderada sobre los receptores objeto de estudio. Papel de la adenosina.
4. Efecto de la toxicidad inducida por la exposición al péptido amiloide sobre los receptores objeto de estudio.
5. Modulación de estos receptores por estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.
6. Estudio de la modulación de los receptores de adenosina durante el envejecimiento en modelos animales.

MATERIALES *y* MÉTODOS

III.1. Materiales.

Los radioligandos utilizados para los estudios de receptores de adenosina [^3H]DPCPX (118 Ci/mmol) y [^3H]ZM241385 (27,4 Ci/mmol), fueron obtenidos de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Reino Unido) y Tocris Cookson Ltd (Bristol, Reino Unido), respectivamente. Para estudiar los receptores metabotrópicos de glutamato se utilizó el radioligando L-[^3H]Glu (49,9 Ci/mmol) procedente de Perkin Elmer (Boston, EEUU). El [^3H]AMPc (27,4 Ci/mmol), se obtuvo de Perkin Elmer (Boston, EEUU).

Fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, EEUU) los siguientes compuestos: péptido amiloide (1-42 y 25-35), dipiridamol, CPA, CHA, AMPA, NMDA, ácido kaínico, teofilina, forskolina, NECA, PKA, R-PIA, ATP, PFA, adenosina, Ro 20-1724, dipiridamol, creatina quinasa, creatina fosfato, inhibidores de proteasas, bacitracina, PSMF, toxina pertúsica y el kit MTT. El ligando ácido L-glutámico es de la casa comercial Tocris Cookson Ltd. (Bristol, Reino Unido), así como los ligandos (1S,3R)-ACPD, (2R,4R)-APDC, L-AP4, CGS 21680, PSB 1115 y ZM241385.

Las sustancias químicas, los medios y las placas empleadas para la realización y el mantenimiento de los cultivos celulares se obtuvieron de Gibco BRL (Maryland, EEUU), excepto el suero fetal bovino que se obtuvo de PAA (Parching, Austria).

Los materiales relacionados con la electroforesis de proteínas, a menos que se indique lo contrario, provienen de Bio-Rad (California, EEUU). La procedencia de sustancias relacionadas con la inmunofluorescencia se detalla más adelante en el texto.

Los reactivos empleados en los experimentos de PCR, cuantitativa o clásica, fueron adquiridos de Applied Biosystems (California, EEUU), a menos que se indique lo contrario.

La enzima adenosina desaminasa (ADA) fue adquirida de Roche Diagnostics (Basel, Suiza).

Todos los líquidos de centelleo fueron adquiridos de Perkin Elmer (Massachusetts, EEUU).

El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

III.2. Animales.

Durante la parte experimental se emplearon dos tipos de animales: ratas Wistar gestantes, para la realización de cultivos primarios de neuronas corticales, y algunas cepas de ratones de senescencia acelerada (SAM), para su estudio como modelo de envejecimiento.

Las ratas utilizadas para obtener los cultivos primarios de neuronas corticales fueron criadas en el animalario del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de la Universidad Autónoma de Madrid, en condiciones estériles, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, humedad relativa del 50-55% y temperatura de 20-25°C. Para estos cultivos se usaron fetos a día embrionario 18 provenientes de ratas de la raza Wistar albinas de 3 meses de edad. Los animales se alimentaron con una dieta estándar de laboratorio y tuvieron libre acceso al alimento y al agua de bebida.

Con motivo de realizar el estudio de la variación de los receptores de adenosina durante el envejecimiento se empleó el modelo de ratones de senescencia acelerada SAM. Este modelo se estableció en 1981 por selección fenotípica de una cepa común de ratones AKR/J (Takeda y col., 1981), subcepas más sensibles al envejecimiento (*prone*; SAMP) y subcepas más resistentes (*resistant*; SAMR).

En los estudios aquí presentados se han empleado las subcepas SAMR1, como modelo de envejecimiento fisiológico, y SAMP8, como modelo de envejecimiento acelerado, amablemente cedidas por el Dr. Antoni Camins, de la Universidad de Barcelona. Entre las características de los ratones SAMP8 se encuentran: deficiencias en el aprendizaje y la memoria relacionadas con la edad, disfunciones del sistema inmune y deposición dependiente de la edad del péptido amiloide. Para estos estudios se han empleado las subcepas SAMR1 y SAMP8, a las edades de 3 semanas y 6 meses.

Todos los experimentos realizados con animales siguieron las normas fijadas por la Comunidad Europea acerca de la experimentación animal así como la regulación específica del Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Castilla-La Mancha.

III.3. Cultivo celular de la línea C6.

Los astrocitos son los responsables de la recaptación y el metabolismo de la mayor parte de glutamato en el cerebro. Éstos, a diferencia de las neuronas, poseen una elevada actividad glutamina sintetasa, una enzima exclusiva de las células gliales que convierte el glutamato en glutamina a través de una reacción de amidación que consume energía. Debido al papel del glutamato en muchas enfermedades neurodegenerativas y a la capacidad de la adenosina de modular la liberación de éste usamos la línea celular C6 derivada de astrocitoma de rata como modelo de estudio.

Las células C6 de glioma de rata (Benda y col., 1968) se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (ATCC; CCL-107™) y fueron crecidas en placas Nunc en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* con L-Glucosa 4,5 g/L) conteniendo tampón HEPES 12,6 mM, NaHCO₃ 10,11 mM, ácido pirúvico 1 mM, suplementado con 10% suero fetal bovino (previamente descomplementado), L-glutamina 2 mM, 1% aminoácidos no esenciales, 1% antibiótico-antimicótico y gentamicina 50 µg/mL. Las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera húmeda de 5% CO₂ / 95% aire. Imágenes representativas de estas células se exponen en la Ilustración 19.

Las condiciones de hipoxia empleadas se controlaron en un incubador Forma Series II (Termo Electron Corporation). En estos experimentos, las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera húmeda de 5% CO₂ / 5% O₂ / 90% N₂ durante los tiempos indicados en cada experimento.

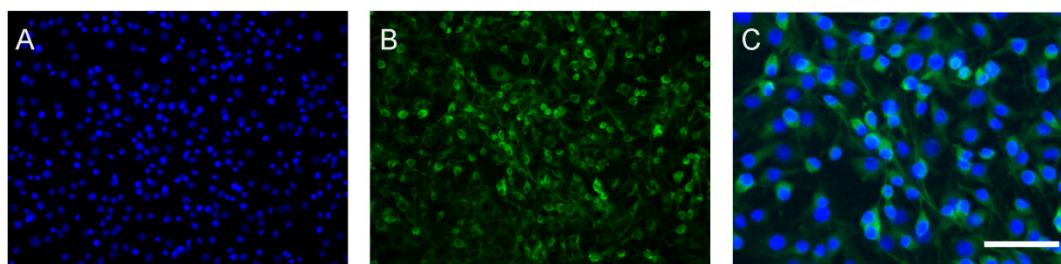


Ilustración 19: Ensayos de inmunofluorescencia en las células C6. A, tinción con Hoechst. B, inmunodetección de GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*). C, mezcla de A y B. La barra representa 240 μm en C y 100 μm en A y B.

III.4. Cultivos primarios de neuronas corticales de cerebro de rata.

Los cultivos primarios fueron obtenidos de embriones de ratas de la cepa Wistar a 18 días de gestación. Los cerebros fetales fueron diseccionados y colocados en PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,9 g/L y KH_2PO_4 0,2 g/L, pH 7,4) suplementado con glucosa 6 mM y BSA 1%. Después de separar las meninges, las cortezas seccionadas se incubaron con 30 U/mL de papaína durante 5 minutos a 37 °C para ser posteriormente disgregadas mecánicamente con ayuda de una pipeta Pasteur. Una vez disgregado el tejido, se añadieron 10 mg de DNasa y las células disociadas se filtraron por gravedad a través de un filtro de 70 μm de tamaño de poro (BD Falcon). El filtrado se centrifugó a 300 g durante 6 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en MEM (*Minimum Essential Medium*) suplementado con NaHCO_3 2,2 g/L, Glutamax I 10 ml/L, HEPES 2,6 g/L, antibiótico-antimicótico 10 ml/L, B27 y 10 % de suero de caballo (previamente desactivado), a una densidad de $4 \cdot 10^5$ células/mL. Las células fueron plaqueadas en placas recubiertas de poli-L-lisina (BD Falcon) ($2,6 \cdot 10^5$ células por pocillo en placas de 24 pocillos; $8 \cdot 10^4$ células por pocillo en placas de 96 pocillos; $8 \cdot 10^4$ células por pocillo en placas de 10 cm de diámetro) y mantenidas a 37 °C en atmósfera húmeda de 5% CO_2 / 95% aire. Al día siguiente se cambió la totalidad del medio por medio Neurobasal (NB) suplementado con B27. A los 2 días *in vitro* (DIV) se añadió citosina arabinosa (AraC) a una concentración final de 5 μM . A los 7 y 14 DiV se desechó la mitad del medio y se repuso medio NB suplementado con B27. Todos los experimentos fueron realizados entre los 14 y los 18 DIV, lo que se corresponde con la madurez del cultivo. Un resumen de este proceso, junto con imágenes representativas de algunos días de cultivo, se expone en la Ilustración 20. Esporádicamente se comprobó la contaminación glial del cultivo mediante inmunodetección de GFAP, un experimento representativo se expone en las Ilustraciones 21 y 22.

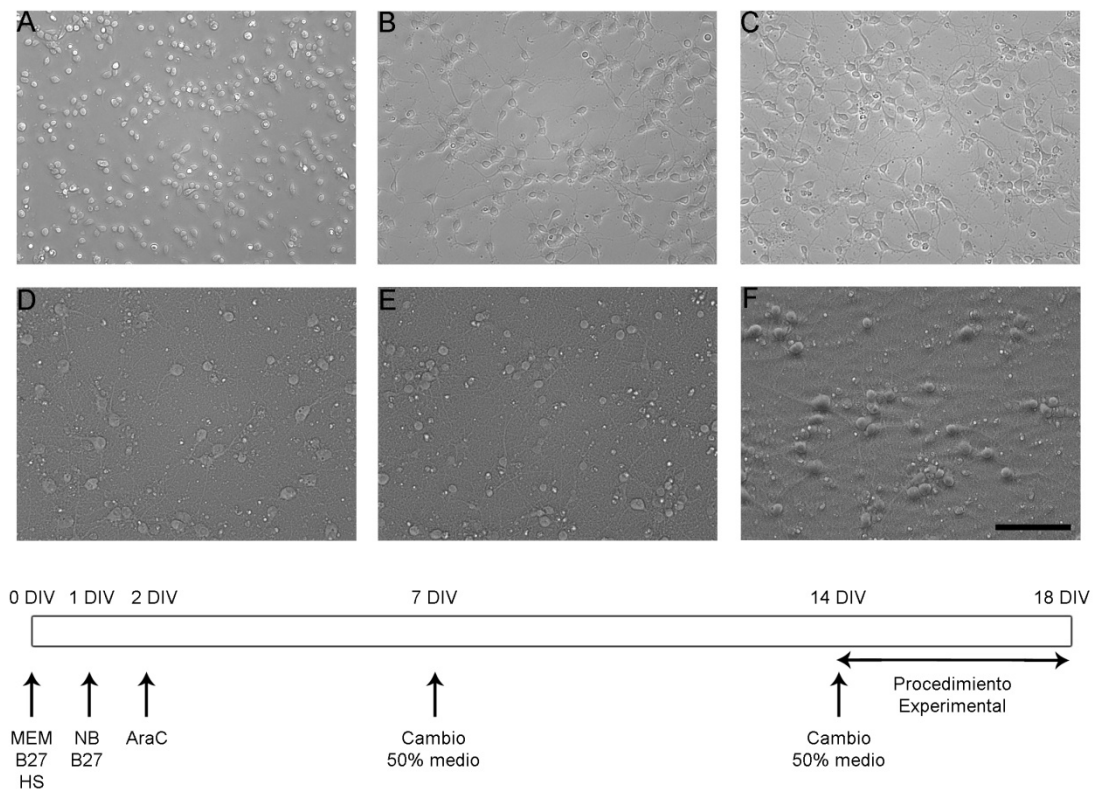


Ilustración 20: Imágenes representativas en contraste de fases del desarrollo de un cultivo primario de neuronas de corteza de cerebro de rata. Todas las imágenes fueron tomadas con el objetivo 20X. A. Células a 0 DIV. B. Primer DIV. C. 2 DIV tras el tratamiento con AraC. D. 15 DIV. E. 16 DIV. F. 17 DIV, la barra representa 100 µm. En el panel inferior se esquematizan los cambios de medio realizados durante un cultivo cualquiera. La barra representa 100 µm.

III.5. Aislamiento de membranas plasmáticas.

Las membranas plasmáticas de células C6, neuronas de cultivos primarios o cerebro de animal fueron aisladas siguiendo el método descrito previamente por este grupo de investigación ([Albasanz y col., 2002a](#); [León y col., 2002](#)). Brevemente, tras eliminar el medio se lavó cada placa con 2 mL aproximadamente de tampón de aislamiento (Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, pH 7.4) que contenía los inhibidores de proteasas bacitracina (100 µg/mL) y PSMF (100 µM). Seguidamente las células de cada placa fueron recogidas en 3 mL de tampón de aislamiento y homogeneizadas en un homogeneizador Dounce (10xA, 10xB), se centrifugaron 5 minutos a 2000 rpm en una centrifuga Beckman JA 20 y los sobrenadantes obtenidos se volvieron a centrifugar durante 30 minutos a 15.000 rpm.

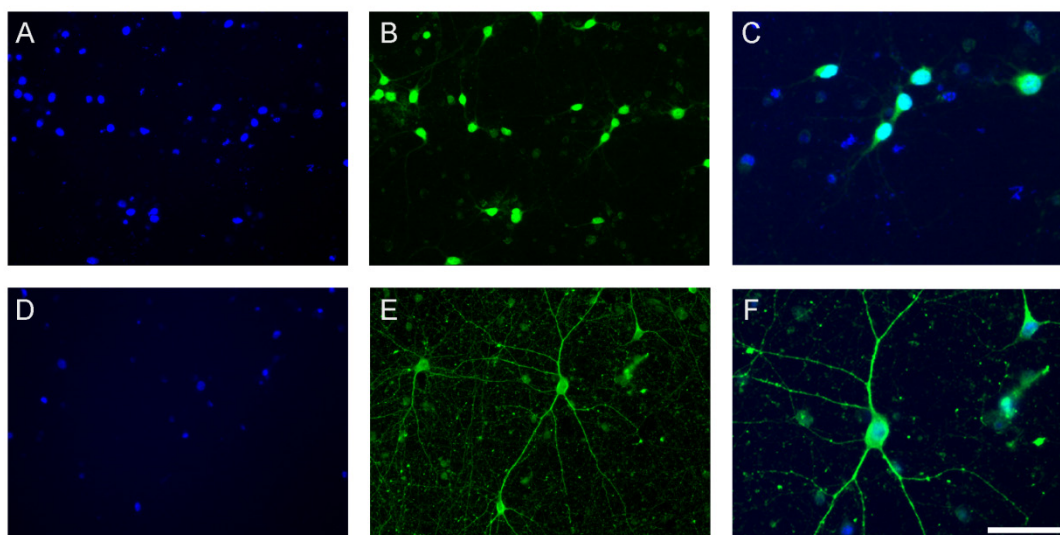


Ilustración 21: Imágenes representativas de experimentos de inmunofluorescencia a 16 DIV (I). A y D, tinción con Hoechst. B y E, inmunodetección de NeuN (*Neuronal Nuclei*) y β -tubulina, respectivamente. C y F, mezclas de las imágenes anteriores. La barra representa 240 μ m en C y F y 100 μ m en A, B, D y E.

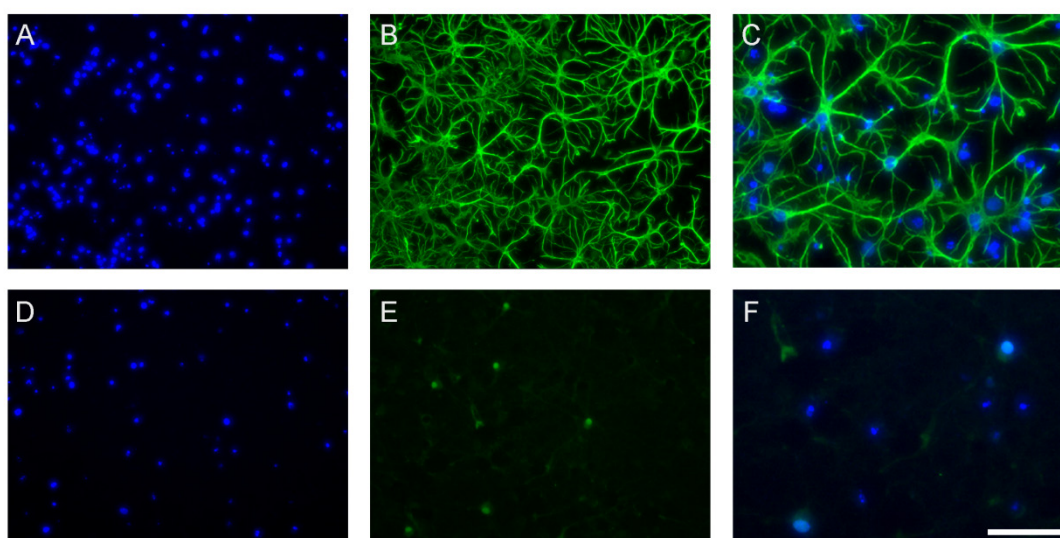


Ilustración 22: Imágenes representativas de experimentos de inmunofluorescencia a 16 DIV (II). Paneles A-C, cultivos sin tratar con AraC. Paneles D-F, cultivos corrientes. A y D, tinción con Hoechst. B y E, inmunodetección de GFAP. C y F, mezclas de las imágenes anteriores. La barra representa 240 μ m en C y F y 100 μ m en A, B, D y E.

El sedimento se resuspendió de nuevo en tampón de aislamiento y se homogeneizó en un Dounce (10xA, 10xB), se repartió en alícuotas que se congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a $-80^\circ C$ hasta su uso.

En el caso del aislamiento de membranas plasmáticas procedentes de tejido, el esquema de centrifugación empleado fue el mismo que para la línea celular pero se partió de un homogenado. Así, cerebros completos de los animales de estudio fueron resuspendidos en 20 volúmenes del tampón de aislamiento

descrito y homogeneizados en Dounce (10xA, 10xB). Este homogenado se sometió al proceso de centrifugación diferencial descrito anteriormente.

III.6. Reacción en cadena de la Polimerasa clásica.

En los experimentos realizados para identificar los receptores de adenosina en las células C6 el modo de PCR empleado fue la RT-PCR clásica. El RNA fue aislado por extracción con tiocianato de guanidinio / fenol / cloroformo según el método descrito por Chomczynski y Sacchi ([Chomczynski y Sacchi, 1987](#)). Tras el tratamiento con 10 U de DNase (libre de RNases) durante 30 minutos a 37 °C se provocó la desnaturalización de la enzima por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos.

Se tomaron 5 µg del RNA total y se retrotranscribieron a ADNc en Tris-HCl 50 mM pH 8,3 conteniendo KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 2,5 mM, dNTPs 1 mM, pd(N)₆ cebadores aleatorios (Boehringer-Manheim), 40 U de inhibidor de RNases y 200 U de M-MVL transcriptasa reversa (BRL), transcurriendo la reacción durante 60 minutos a 37 °C. Posteriormente se llevó a cabo la PCR siguiendo el método descrito por Vendite y colaboradores en 1998, el ADNc fue amplificado en Tris-HCl 20 mM pH 8,3 conteniendo KCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,2 mM, cebadores 5' 1 µM, cebadores 3' 1 µM y 2 U de Taq polimerasa. Los oligonucleótidos iniciadores utilizados en la amplificación de cada gen, así como el tamaño esperado para los diferentes fragmentos amplificados por PCR, se resumen en la Tabla 3.

Se analizaron 15 µL de ADNc amplificado por electroforesis en geles de agarosa al 2% y posterior tinción con bromuro de etidio para su visualización con luz UV.

III.7. Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa.

Para los experimentos de cuantificación de la cantidad de RNA por PCR a tiempo real presentados en la presente Memoria, el aislamiento de RNA fue llevado a cabo, tanto en el caso de cultivos celulares como en el caso de cerebros de ratón, en un equipo *ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation* (Applied Biosystems) siguiendo los protocolos indicados por el fabricante.

La reacción de retro-transcripción se llevó a cabo en un equipo *Prism 7500 Fast Sequence Detection System* (Applied Biosystems) empleando el *High Capacity ADNc Archive Kit* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. El termociclador se programó 10 minutos a 25 °C, para maximizar la unión entre los cebadores aleatorios y el RNA, tras los cuales se dejó transcurrir la reacción durante 2 horas a 37 °C. Antes de almacenar el ADNc a -80 °C se matuvo la mezcla de reacción a 85 °C durante 5 segundos con el fin de desactivar la transcriptasa inversa.

Gen amplificado	Acceso GenBank	Tamaño del fragmento	Secuencias
A ₁	AB001089	630 pb	(A): 5'-ATCCCACTGGCCATCCTTATC-3' (B): 5'-TGGCGATGTAGATCAGAATGC-3'
A _{2A}	NM_017161	150 pb	(A): 5'-CCATGCTGGGCTGGAACA-3' (B): 5'-GAAGGGGCGAGTAACACGAACG-3'
A _{2B}	M91466	160 pb	(A): 5'-TGGCGCTGGAGCTGGTTA-3' (B): 5'-GCAAAGGGGATGGCGAAG-3'
A ₃	NM_012896	655 pb	(A): 5'-AGAGCTAGGTCCACTGGC-3' (B): 5'-GCACATGACAACCAAGGGGATGA-3'
G ₁₁ α	M17527	1080 pb	(A): 5'-AAGGACAGCGGTGTGCAAGCCTGCTTCAAC-3' (B): 5'-AATCTGTCATTCCGTACAAGGTACTTAACA-3'
G ₁₂ α	M17528	530 pb	(A): 5'-AGTATGACGAGGCAGCCAGCTACATCCAGAGCAA-3' (B): 5'-GTACTCTCCAGACATAGGCCTTGGGAACTCTGC-3'
G ₁₃ α	M20713	680 pb	(A): 5'-TGCTAGGAGACGTCTAAGAGTATA-3' (B): 5'-GCTTGCTTCCCAAGCAGTTCTGA-3'
G ₅ α	NM_019132	770 pb	(A): 5'-GCAGGCTGCAAGGAGCAACAGCGA-3' (B): 5'-CCGGGTCACGCGTGGGTCCTC-3'
β-actina	NM_031144	320 pb	(A): 5'-GGTATGGAATCTGTGCGCATCCATGAAA-3' (B): 5'-GTGTAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

Tabla 3: Cebadores utilizados para la PCR en la amplificación de cada gen. El ADNc correspondiente a los distintos genes indicados en la tabla se amplificó mediante el uso de un oligonucleótido directo (A, cebador 5') e inverso (B, cebador 3'), de los cuales se especifica el código de acceso de *GenBank* de cada gen y el tamaño del fragmento amplificado.

La PCR cuantitativa fue llevada a cabo en el mismo equipo que la retro-transcripción empleando el sistema *TaqMan® universal PCR master mix* (Applied Biosystems) para detectar los genes deseados. En cada amplificación se emplearon 10 ng de ADNc. Los cebadores y las sondas están patentados así que la secuencia no está disponible. Cabe destacar que se intentó amplificar el gen mGlu₅ en C6 empleando dos sondas diferentes en condiciones en las que se observaba amplificación con muestras obtenidas de cultivos primarios de neuronas corticales y, en ninguno de los dos casos, se observó amplificación alguna.

Se empleó el gen de la β-actina como control endógeno. Las sondas se marcaron con el fluoróforo FAM en el extremo 5' y con un agente apantallante (*quencher*) en el extremo 3'. La fluorescencia de fondo se midió añadiendo el fluoróforo ROS. Las secuencias de las sondas son propiedad de *Applied Biosystems* por lo que no están disponibles. Las sondas fueron empleadas siguiendo las especificaciones del fabricante y todas ellas son productos validados por el mismo.

El termociclador se programó 20 segundos a 95 °C seguido de 40 ciclos de 3 segundos a 95 °C y 30 segundos a 60 °C. Los niveles de expresión se analizaron empleando el programa *7500 Fast System SDS* (versión 1.3.1) usando el método comparativo C_t para calcular el parámetro R_q representado (Schmittgen y Livak, 2008).

Los resultados de expresión fueron normalizados para cada gen con los del control interno (β -actina) y relativizados con respecto a un calibrador. Matemáticamente la ecuación empleada fue:

$$Rq = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-((Ct \text{ gen diana} - Ct \beta\text{-actina})_{\text{muestra}} - (Ct \text{ gen diana} - Ct \beta\text{-actina})_{\text{calibrador}})}$$

Donde Ct es el ciclo umbral, esto es, el ciclo en el que la fluorescencia emitida es diez veces mayor que el ruido.

III.8. Determinación de receptores metabotrópicos de glutamato mediante ensayos de unión de L-[³H]Glutamato en células intactas.

Los receptores metabotrópicos de glutamato se determinaron mediante ensayos de unión usando L-[³H]Glu como radioligando, según el método descrito previamente en este grupo de investigación ([Albasanz y col., 2002a](#)).

Los ensayos de unión a los receptores metabotrópicos se llevaban a cabo bloqueando la unión a los receptores ionotrópicos, en presencia de 10 μ M de AMPA, 100 μ M de NMDA y Kaínico ([Cha y col., 1990](#)), y el transporte de glutamato con 10 μ M de ácido DL-treo- β -hidroxiaspártico ([McBean y Roberts, 1985](#); [Kimelberg y col., 1989](#)).

Después de eliminar el medio de cultivo celular se lavaron las células con medio de cultivo sin completar (DMEM con L-Glucosa 4,5 g/L conteniendo tampón Hepes 12,6 mM, NaHCO₃ 10,11 mM, ácido pirúvico 1 mM), a continuación se añadieron los agentes bloqueantes de los receptores ionotrópicos y del transporte de glutamato y L-glutamato sólo en aquellos pocillos en los que se iba a medir la unión inespecífica. Para la realización de las curvas de saturación las células fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de L-[³H]Glu (0,15 hasta 1,2 μ M) durante una hora a 37 °C usando L-glu frío 10 mM final como ligando para determinar la unión inespecífica, en un volumen final de 250 μ L. El ensayo se detuvo aspirando el medio radiactivo y lavando los pocillos con medio de cultivo sin completar a 4 °C.

Las células se lisaron con SDS 0,1 % y se llevaron a viales de centelleo a los que se añadieron 3 mL de líquido de centelleo *Optiphase HiSafe 3* y se contaron en un contador *MicroBeta Jet* (Perkin Elmer).

En cada ensayo se midió la unión total y la inespecífica para cada concentración por duplicado.

III.9. Determinación de los receptores de adenosina mediante ensayos de unión de [3 H]DPCPX o [3 H]ZM241385 en células intactas.

– Ensayos de unión de [3 H]DPCPX.

Los ensayos de unión de radioligandos al receptor A_1 de adenosina fueron realizados en células intactas según el método descrito previamente por este grupo (Ruiz y col., 2000). Para ello, se empleó [3 H]DPCPX como antagonista específico de los receptores A_1 .

Después de eliminar el medio de cultivo se lavaron las células con medio de cultivo sin completar y se incubaron con 2 U/mL de ADA a 25 °C durante 30 minutos con el fin de eliminar la adenosina endógena. A continuación se añadió dipiridamol 1 μ M final en todos los pocillos, para bloquear los transportadores de adenosina, y CPA 4 mM final, para medir la unión inespecífica en aquellos pocillos que correspondía. Se incubaron durante 2 horas a 25 °C con [3 H]DPCPX a las concentraciones correspondientes (de 1 a 20 nM final, a menos que se indique lo contrario). El ensayo se detuvo aspirando el medio radiactivo y lavando los pocillos con medio de cultivo sin completar a 4 °C.

Las células se lisaron con SDS 0,1 % y se llevaron a viales de centelleo que se rellenaron con líquido de centelleo *Optiphase HiSafe 3* y se contaron en un contador *MicroBeta Jet* (Perkin Elmer).

En cada ensayo se midió la unión total y la inespecífica para cada concentración por duplicado.

Las curvas de competición se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento usando una única concentración de [3 H]DPCPX (15 nM) y distintas concentraciones de los ligandos a ensayar.

– Ensayos de unión de [3 H]ZM241385.

Los ensayos de unión de radioligandos al receptor A_{2A} de adenosina fueron realizados en células intactas usando el antagonista específico tritiado para el receptor A_{2A} [3 H]ZM241385.

Este ensayo es igual que la unión a receptores A_1 pero en este caso se usó teofilina 9 mM final como ligando frío para valorar la unión inespecífica y distintas concentraciones del radioligando (de 1 a 20 nM final, a menos que se indique lo contrario).

Las curvas de competición se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento usando una única concentración de [3 H]ZM241385 (15 nM) y distintas concentraciones de los ligandos a ensayar.

Las células se lisaron con SDS 0,1 % y se llevaron a viales de centelleo que se rellenaron con líquido de centelleo *Optiphase HiSafe 3* y se contaron en un contador *MicroBeta Jet* (Perkin Elmer).

En cada ensayo se midió la unión total y la inespecífica para cada concentración por duplicado.

III.10. Determinación de los receptores de adenosina mediante ensayos de unión de [3 H]DPCPX o [3 H]ZM241385 en membranas plasmáticas.

– Ensayos de unión de [3 H]DPCPX

Los ensayos de unión de radioligandos al receptor A_1 de adenosina fueron realizados en membranas plasmáticas según el método descrito previamente por este grupo de investigación (Ruiz y col., 2000).

Previamente a la realización del ensayo de unión las membranas plasmáticas fueron incubadas con 2 U/mg de adenosina desaminasa (ADA) en tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, pH 7,4) durante 30 minutos a 25 °C, para eliminar la adenosina endógena. A continuación, se añadieron los diferentes ligandos en presencia de 75 μ g de proteína en un volumen final de 250 μ L y se incubaron durante 2 horas a 25 °C en agitación. Transcurrido este tiempo se paró la reacción por filtración usando un equipo *Filtermate-harvester* (Perkin Elmer) y la radiactividad obtenida se cuantificó en un contador *MicroBeta Jet* (Perkin Elmer) usando líquido de centelleo *Betaplate Scint* (Perkin Elmer).

Las curvas de saturación se realizaron usando diferentes concentraciones del radioligando [3 H]DPCPX (1 a 20 nM) y CPA como ligando frío a una concentración de, al menos, 10^4 veces la del radioligando, para determinar la unión inespecífica.

– Ensayos de unión de [3 H]ZM241385

El mismo método fue utilizado para la determinación de receptores A_{2A} de adenosina empleando 75 μ g de muestra y utilizando teofilina 3 mM como desplazante. De nuevo, transcurrido el tiempo de incubación se paró la reacción por filtración usando un equipo *Filtermate-harvester* (Perkin Elmer) y la radiactividad obtenida se cuantificó en un contador *MicroBeta Jet* (Perkin Elmer) usando líquido de centelleo *Betaplate Scint* (Perkin Elmer).

III.11. Determinación de la actividad adenilato ciclasa.

- En células intactas

La actividad adenilato ciclasa se determinó, en células intactas, siguiendo el método descrito por Murphy y colaboradores (Murphy y col., 1991) con algunas modificaciones (Ruiz y col., 2000). Tras lavar las células dos veces con medio de cultivo sin completar, se incubaron durante 10 minutos a 37 °C con el inhibidor de fosfodiesterasas Ro 20-1724 100 μ M y con 2 U/mL de ADA, en un volumen final de medio de 225 μ L. Tras la incubación se inició la reacción con los agentes correspondientes y se dejó transcurrir durante 15 minutos a 37 °C para posteriormente detenerla con HCl 0,1 N en EtOH absoluto. El contenido de cada pocillo se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga de mesa (Hettich) y el sobrenadante se evaporó en *speed-vac* (Heto) durante 3 horas para añadirle después 150 μ L de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 conteniendo EDTA 4 mM.

La determinación de los niveles de AMPc se llevó a cabo según el método descrito inicialmente por Nordstedt y Fredholm en 1990. Se determinó la cantidad de AMPc en 50 µL de cada muestra usando 6,25 µg de proteína quinasa A como proteína de unión al AMPc y 0,25 pmol de [³H]AMPc como trazador. Así se incubó todo en medio Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 4 mM a 4 °C durante un mínimo de 2 y un máximo de 18 horas. Al mismo tiempo se construyó una curva patrón sobre la que interpolar los datos obtenidos con concentraciones de AMPc de 0,25 a 32 pmol. La reacción se paró por filtración usando un *Filtermate-harvester* (Perkin Elmer) y la radiactividad obtenida se cuantificó en un contador *MicroBeta Jet* (Perkin Elmer) usando líquido de centelleo *Betaplate Scint*.

- **En membranas plasmáticas.**

La actividad adenilato ciclasa en membrana plasmática de cerebro fue determinada siguiendo el método inicialmente descrito por Malbon y colaboradores (Malbon y col., 1985). El ensayo se llevó a cabo con 20 µg de membranas plasmáticas, las cuales habían sido pretratadas con adenosina desaminasa, 0,2 U/mg, en tampón de ensayo (Tris 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, pH 7,4) durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, las membranas fueron incubadas en tampón de ensayo durante 6 minutos a 30 °C en un volumen final de 250 µL, conteniendo Ro 20-1724 100 µM, sistema regenerador (albúmina 1 mg/mL, creatina quinasa 1 mg/mL y creatina fosfato 10 mM) más los ligandos cuya potencia se quería probar. La reacción se inició con la adición de ATP 200 µM y se prolongó durante 10 minutos a 30 °C. Finalizado este tiempo la reacción fue detenida hirviendo las muestras durante 2 minutos con posterior centrifugación a 12000 g. Del sobrenadante obtenido se recogieron 50 µL que fueron usados para determinar los niveles de AMP cíclico (AMPc).

La determinación fue llevada a cabo según se ha descrito en el apartado anterior.

III.12. Ensayo de viabilidad: test basado en MTT.

La viabilidad celular fue determinada por un método colorimétrico utilizando un kit de viabilidad celular basado en el compuesto bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el cual es fragmentado por deshidrogenasas mitocondriales dando lugar a cristales de formazán, insolubles en medios acuosos. Estos cristales se disuelven en una disolución ácida de isopropanol y la variación de la medida espectrofotométrica a 570 nm se toma como una variación de la cantidad de células causada por el agente tóxico ensayado.

Brevemente, se trataron la misma cantidad de células en placas de 96 pocillos con los distintos agentes a los tiempos correspondientes más las células llevadas como control, incubadas con el mismo volumen de medio completo. Tras el tratamiento se añadieron 10 µL de una disolución de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo y las células se incubaron a 37 °C durante 3 horas. A los cristales formados se les añadió 100 µL de la disolución de solubilización (Tritón X-100 10%, HCl 0,1 N en isopropanol anhidro) y se dejaron solubilizar durante toda la noche. A la mañana siguiente, la absorbancia se midió a 570 nm y el fondo a 690 nm.

III.13. Ensayo de actividad caspasa 3.

Se empleó para realizar este ensayo un kit comercial (Molecular Probes, Barcelona, España) basado en el diseño de un sustrato fluorescente susceptible de ser cortado proteolíticamente de forma específica por caspasa 3. Brevemente, las células empleadas en estos ensayos provenían de placas P24, en las que se las sometió o no a los correspondientes agentes cuya influencia sobre la actividad de caspasa 3 se deseaba estudiar. Las células se lisaron empleando 50 μ L del tampón de lisis incluido en el kit durante 30 minutos, transcurridos los cuales los lisados se centrifugaron durante 5 minutos a máxima velocidad en una centrífuga de mesa. A los sobrenadantes obtenidos se les añadió 50 μ L de tampón de ensayo, conteniendo Z-DEVD-Rodamina110, DTT, EDTA, PIPES y CHAPS, en las proporciones indicadas por el fabricante. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de cada muestra en un lector de placas (excitación/emisión \sim 496/520 nm). Los incrementos en la actividad caspasa 3, se determinaron comparando los datos obtenidos para las muestras tratadas por algún agente, con aquellos obtenidos para las muestras controles.

III.14. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes: PAGE-SDS.

La separación electroforética de las proteínas presentes en las membranas plasmáticas aisladas, se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las distintas muestras se resuspendieron en el tampón de carga de electroforesis o tampón de Laemmli, (SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10%, Tris-HCl 62 mM, pH 6,8 y azul de bromofenol 0,002%) y fueron posteriormente hervidas durante 5 minutos, centrifugadas y enfriadas.

Las muestras se sometieron a electroforesis en minigeles de poliacrilamida-SDS, con un 10% de acrilamida y un grosor de 1,5 mm para separar en el mismo gel proteínas de alto y bajo peso molecular. Como patrones de peso molecular, se emplearon marcadores preteñidos (*Precision Plus Protein Standard dual colors*), mezcla de proteínas recombinantes de tamaños 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 y 250 kDa, para determinar electroforéticamente el peso molecular de proteínas de interés.

El tampón utilizado en la electroforesis estaba compuesto por 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS. En todos los casos, la cantidad de proteína por carril fue, a menos que se indique lo contrario, de 30 μ g.

III.15. Inmovilización de proteínas: transferencia a membrana. Inmunodetección de proteínas.

La transferencia de las proteínas separadas electroforéticamente a membrana fue llevada a cabo gracias a un equipo *iBlot™ Dry Blotting System* (Invitrogen, Barcelona, España), empleando membranas de nitrocelulosa (Invitrogen) a un voltaje de 20 V durante un tiempo no superior a 8 minutos.

Una vez transferidas las proteínas, la unión inespecífica a las membranas de nitrocelulosa fue bloqueada incubando las mismas, durante al menos 1 hora, con tampón de bloqueo, una disolución al 5% de leche desnatada en polvo en medio PBS-Tween 20 (NaCl 13,7 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, KH_2PO_4 1,7 mM y

Tween 20 0,1%). Posteriormente, las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 20 durante tres ciclos de 5 minutos (3x5') y, a continuación, incubadas con los anticuerpos primarios específicos, diluídos en el mismo tampón, durante toda la noche a 4 °C. Una vez retirado el anticuerpo, las membranas fueron lavadas de nuevo (3x5') e incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano, durante 30 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo. Tras la incubación, se repitieron los lavados (3x5') y finalmente, para la detección de los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y unidos a las proteínas de interés, se utilizó el sistema quimioluminiscente ECL suministrado por Amersham Pharmacia Biotech (Barcelona, España).

<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Dilución de uso</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Anticuerpo secundario</i>	<i>Dilución de uso</i>	<i>Casa comercial</i>
A₁	1/1000	Calbiochem	GAR-PO	1/5000	Bio-Rad
A_{2A}	1/100	Santa Cruz Biotechnology	DAG-PO	1/3000	Santa Cruz Biotechnology
A_{2A}	1/500	Upstate	GAM-PO	1/5000	Bio-Rad
A_{2B}	1/100	Santa Cruz Biotechnology	DAG-PO	1/3000	Santa Cruz Biotechnology
A₃	1/500	Sigma	GAR-PO	1/5000	Bio-Rad
αG_{i1-2}	1/1000	Dupont-NEN	GAR-PO	1/5000	Bio-Rad
αG_{i3}	1/1000	Dupont-NEN	GAR-PO	1/5000	Bio-Rad
αG_s	1/1000	Santa Cruz Biotechnology	GAR-PO	1/5000	Bio-Rad
mGlu₁	1/1000	Upstate	GAR-PO	1/5000	Bio-Rad
mGlu₅	1/1000	Upstate	GAR-PO	1/5000	Bio-Rad
mGlu_{2,3}	1/1000	Tocris	GAR-PO	1/5000	Bio-Rad
PLCβ₁	1/1000	Upstate	GAM-PO	1/5000	Bio-Rad
AC I	1/1000	Abcam	GAR-PO	1/5000	Bio-Rad

Tabla 4: Resumen de los anticuerpos primarios y secundarios así como de su procedencia y la dilución empleada para la inmunodetección de proteínas por la técnica de *Western blot*.

Cuando fue necesario, se eliminaron los anticuerpos unidos a las nitrocelulosas por incubación, durante 5 minutos a temperatura ambiente, con el tampón de *stripping* (glicina 0,15%, SDS 0.1%, tween-20 1%, pH 2.2). Después de esta incubación las nitrocelulosas se lavaron de nuevo (3x5') y comenzó de nuevo el proceso de bloqueo.

Las bandas visualizadas en las autorradiografías se cuantificaron por densitometría en un densitómetro GS-690 con el programa informático *Multi-Analyst* versión 1.1 de Bio-Rad.

Los anticuerpos primarios utilizados, así como sus respectivas diluciones de uso, quedan recogidos en la Tabla 4.

III.16. Ensayos de inmunofluorescencia.

Estos ensayos se realizaron en células plaqueadas sobre cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (BD Falcon). Antes de comenzar con el proceso de fijación las células se lavaron con tres ciclos de 5 minutos (3x5') con solución de Locke (NaCl 140 mM, KCl 4,7 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM, HEPES (sal sódica) 10 mM, glucosa 5,5 mM, pH 7,4) para eliminar restos de medio de cultivo. El proceso de fijación fue llevado a cabo empleando paraformaldehído (PFA) al 4% durante treinta minutos, posteriormente los restos de PFA se eliminaron mediante sucesivos lavados (3x5') con solución de Locke. En aquellos pocillos en los que se consideró necesario se permeabilizaron las células con tampón de Locke conteniendo triton X-100 0,25 % durante 10 minutos, seguido de varios lavados (3x5') con solución de Locke, para fomentar la exposición de los antígenos intracelulares.

Con el fin de bloquear las uniones inespecíficas se empleó una disolución de suero normal de cabra (Vector Laboratories, CA, EEUU) al 3% en medio de Locke, durante, al menos, 45 minutos. Tras este periodo de bloqueo se añadieron los anticuerpos primarios, a las diluciones resumidas en la Tabla 5, en medio de bloqueo fresco y se dejaron incubar durante toda la noche con agitación suave a 4 °C.

Al día siguiente, tras tres lavados de cinco minutos con medio de Locke, se añadió el anticuerpo secundario correspondiente. En el caso de las células C6 los anticuerpos secundarios empleados estaban acoplados directamente al fluoróforo que posteriormente se visualizaría, en este caso FITC (fluorescencia verde) o cianina3 (fluorescencia roja). Estos anticuerpos fueron obtenidos de Jackson ImmunoResearch (Pennsylvania, EEUU) y se emplearon a una dilución 1:600 en medio Locke durante 45 minutos.

En el caso de los cultivos primarios, se realizó un paso intermedio de amplificación empleando un anticuerpo secundario biotinilado (1:200; Vector Laboratories). Tras esta primera incubación de 45 minutos de duración, se realizaron tres lavados de 5 minutos con medio Locke y se añadió Streptavidina acoplada a Alexa-488 (fluorescencia verde) o a Alexa-546 (fluorescencia roja), obtenidos de Molecular Probes, a una dilución 1:1000 en medio Locke durante 45 minutos.

<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Dilución de uso</i>	<i>Casa comercial</i>
A₁	1/50	Calbiochem
A_{2A}	1/50	Santa Cruz Biotechnology
A_{2B}	1/50	Santa Cruz Biotechnology
A₃	1/50	Sigma
mGlu₁ (extracelular)	1/200	Alomone
mGlu₅ (extracelular)	1/200	Alomone
mGlu_{2,3} (extracelular)	1/200	Tocris
PLCβ₁	1/500	Upstate
NeuN	1/2000	Chemicon
GFAP	1/400	Sigma

Tabla 5: Resumen de los anticuerpos primarios y secundarios así como de su procedencia y la dilución empleada para la inmunodetección de proteínas.

Tras ambas incubaciones se eliminó el exceso de los agentes empleados con tres lavados de 5 minutos con medio de Locke y se realizó una tinción de la cromatina empleando Hoechst 33258 1 $\mu\text{g/mL}$ en agua (Invitrogen). Tras una incubación de las células de 5 minutos con esta disolución se realizaron sucesivos lavados (3x5') con agua con el fin de eliminar el exceso de agente.

Una vez terminado el proceso los cubreobjetos se montaron sobre porta objetos empleando una gota de *ProLong Gold* (Molecular Probes) para evitar la pérdida de fluorescencia.

- Microscopía y cuantificación.

La toma de imágenes fue llevada a cabo en un microscopio invertido Leica DMI6000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), con el objetivo de 20X (objetivo HCX PL FLUOTAR) acoplado a una cámara digital (Leica DFC350FX).

Cuando fue necesaria la cuantificación de la fluorescencia obtenida en distintas imágenes, con el fin de relacionarla con la expresión proteica en las distintas condiciones experimentales analizadas, se empleó el programa *Leica Application Suite Lite* (versión 2.0, Leica Microsystems). La intensidad de fluorescencia se estimó evaluando el parámetro “suma de píxeles”, en, al menos, 30 campos seleccionados al azar de 40,5 μm de diámetro.

III.18. Evaluación de la morfología nuclear.

El Hoechst o bisbenzimidazoles es un compuesto que se une a los ácidos nucleicos. Utilizando los filtros apropiados, el Hoechst se puede visualizar con luz ultravioleta emitiendo fluorescencia azul. Las células apoptóticas pueden distinguirse por la característica condensación de la cromatina nuclear o por la presencia de fragmentación nuclear.

III.19. Determinación de la concentración de proteína.

Para determinar la concentración de proteína de las diferentes muestras se siguió el método de Lowry (Lowry, 1951) usando albúmina de suero bovino como patrón.

III.20. Análisis de los parámetros cinéticos.

En los ensayos cinéticos los parámetros K_D , constante de disociación del radioligando en el equilibrio, y B_{max} , número máximo de sitios de unión, fueron calculados con el análisis de Scatchard de los datos de unión (representando unión específica partido de concentración de radioligando frente a unión específica) y se corroboraron estos valores mediante regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, California, EEUU). La ecuación utilizada por el programa para el cálculo de estos parámetros fue:

$$Y = \frac{B_{max} \cdot [radioligando]}{K_D + [radioligando]}$$

donde Y es la unión específica para cada punto.

Para el cálculo de la IC_{50} se empleó la ecuación correspondiente a una sigmoide de dosis-respuesta:

$$Y = \text{Mínimo} - \frac{\text{Máximo} - \text{Mínimo}}{1 + 10^{(LogIC_{50} - X)H}}$$

Donde Mínimo y Máximo son los valores de unión específica más bajo y más alto obtenidos en estos ensayos, respectivamente, H es el coeficiente de Hill para la pendiente de la sigmoide, X es la concentración de ligando empleado y el IC_{50} es el valor de concentración de ligando necesario para alcanzar el valor de Y promedio de la curva.

III.21. Análisis estadístico de los datos.

Como medida de tendencia central se ha usado la media, mientras que como medida de dispersión ha sido utilizado el error estándar de la media (SEM).

El test *t* de Student de dos colas ha sido utilizado como test estadístico para calcular significatividades por comparación entre grupos, considerando que las diferencias eran significativas a partir de $p < 0,05$ (95% de nivel de confianza).

III.22. Dilución de los reactivos comerciales.

Los reactivos empleados en los estudios presentados se prepararon en la medida de lo posible el mismo día del ensayo. En caso contrario fueron repartidos en alícuotas, conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y empleados según las instrucciones del fabricante. En el caso de sustancias insolubles en agua, se empleó la mínima cantidad de solvente orgánico, generalmente etanol o DMSO, para su completa disolución, llevándose a cabo los controles apropiados para descartar el efecto del disolvente.

El péptido βA_{1-42} se preparó en agua destilada y se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se mantuvo durante las 24 horas previas a ser empleado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para favorecer su agregación.

RESULTADOS

IV.1 Expresión y caracterización de los receptores en células C6.

a) Receptores metabotrópicos de Glutamato.

La identificación y caracterización de los receptores metabotrópicos ya ha sido llevada a cabo con anterioridad en este grupo de investigación por el Dr. José Luis Albasanz ([Albasanz y col., 1997](#)).

b) Receptores de adenosina.

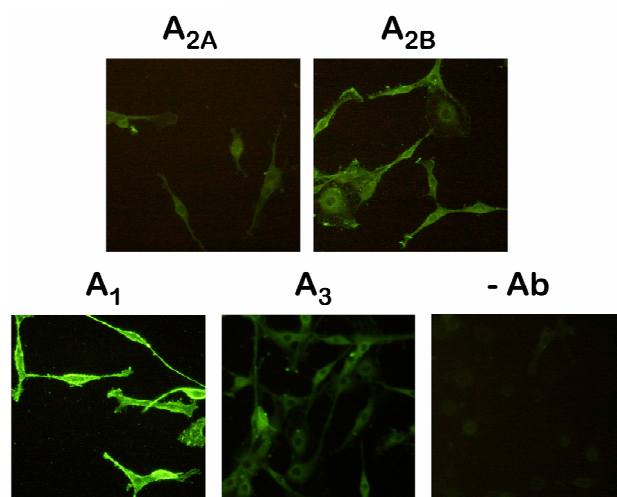
En primer lugar se procedió a la detección de los receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3 en células C6, para ello se emplearon técnicas de inmunofluorescencia y *Western blot*, empleando anticuerpos específicos para dichos receptores, y RT-PCR, con el uso de oligonucleótidos específicos. Así se muestra en la Figura 1 la presencia endógena de los 4 subtipos de receptores de adenosina, descritos hasta la fecha, en células C6 de glioma de rata. En el panel A se observa la inmunodetección de los citados receptores así como el correspondiente control sin el anticuerpo primario. Por su parte, el panel B representa las bandas de 36-40 kDa, 45 kDa, 50 kDa y 44-52 kDa que se corresponden con los pesos moleculares de los receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 , respectivamente, obtenidas a partir de membranas plasmáticas de células C6 analizadas por *Western blot*. Por último, tal y como se muestra en el panel C, se realizó la detección de los referidos receptores a nivel de ARNm empleando cebadores específicos, los cuales se encuentran resumidos en la Tabla 3. Las bandas obtenidas se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

La expresión relativa de los receptores de Adenosina en células C6 a nivel de ARNm fue comprobada empleando la técnica de PCR a tiempo real. En la Figura 2 se muestra el perfil de expresión de los distintos ARNm, siendo éste $A_1 \approx A_3 > A_{2A} > A_{2B}$. Este resultado sugiere que los principales receptores de adenosina expresados por las células C6 son los A_1 y A_3 .

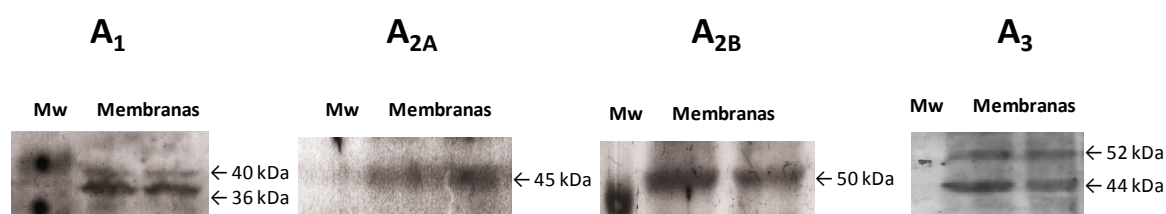
Una vez detectada la presencia de los mencionados receptores se procedió a la determinación de los parámetros cinéticos. Para ello se empleó la técnica de unión de radioligando, usando [3 H]DPCPX como radioligando específico para el receptor A_1 y [3 H]ZM241385 como radioligando específico para el receptor A_{2A} .

Como se observa en la Figura 3, se empleó un rango de concentraciones de 0,5 a 20 nM de radioligando en membranas plasmáticas (panel A) y de 0,5 a 25 nM (panel B) en células intactas, empleándose CPA como desplazante para determinar la unión inespecífica. En ambos casos, se observó un perfil de unión saturable que se ajustaba al modelo de un único lugar de unión. Los resultados obtenidos fueron de una K_D de $9,4 \pm 1,4$ nM y una B_{max} de $62,7 \pm 8,6$ fmol/mg proteína para las membranas y de una K_D de $17,7 \pm 1,3$ nM y una B_{max} de $567,1 \pm 26,5$ fmol/mg proteína para las células intactas. Por otro lado, se demostró que la unión de [3 H]DPCPX era específica del receptor A_1 (panel C), ya que, en las curvas de competición ensayadas con diferentes ligandos específicos, sólo R-PIA y CPA fueron capaces de desplazar la unión del mencionado radioligando.

A



B



C

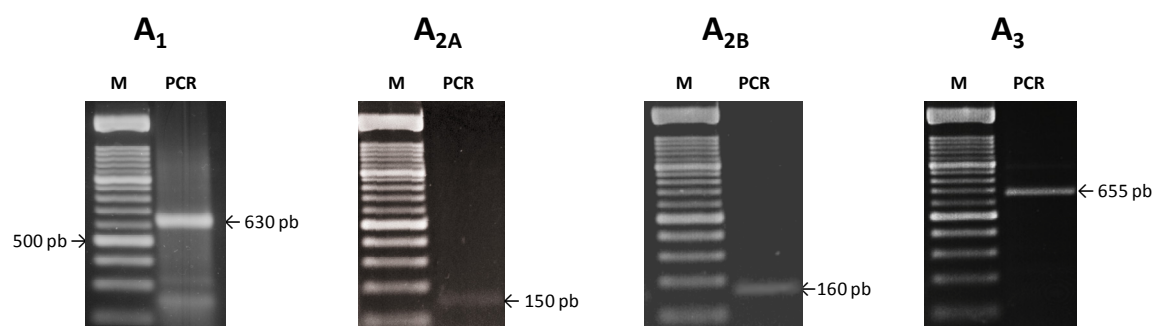


Figura 1. Detección de los receptores de Adenosina en células C6. Panel A. Inmunolocalización de los receptores de Adenosina en células C6, “-Ab” significa que la inmunofluorescencia se realizó en ausencia de anticuerpo primario. Se tomaron imágenes representativas empleando el objetivo 20X. Panel B. 100 μ g de membranas plasmáticas de células C6 se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturizantes, transferidas a nitrocelulosa e incubadas con los anticuerpos correspondientes. Se indica el peso molecular de los fragmentos obtenidos (Mw: marcadores de peso molecular). Panel C. 5 μ g de RNA total de células C6 fueron retro-transcritos y el ADNc obtenido fue amplificado empleando oligonucleótidos específicos, los productos se separaron electroforéticamente en geles de agarosa y las bandas se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Se indica la longitud de los fragmentos obtenidos en cada caso (M: marcador de peso molecular, escalera de 100 pb).

Los mismos experimentos se realizaron para caracterizar los receptores A_{2A} en esta ocasión empleando [3H]ZM241385, un antagonista selectivo de A_{2A} , como radioligando, en un rango de 1 a 20 nM, y teofilina como agente desplazante para medir la unión inespecífica. Se realizaron los ensayos de unión tanto en membranas como en células intactas, obteniéndose en ambos casos una unión específica saturable y ajustable al modelo de un único sitio de unión, tal y como se muestra en la Figura 4.

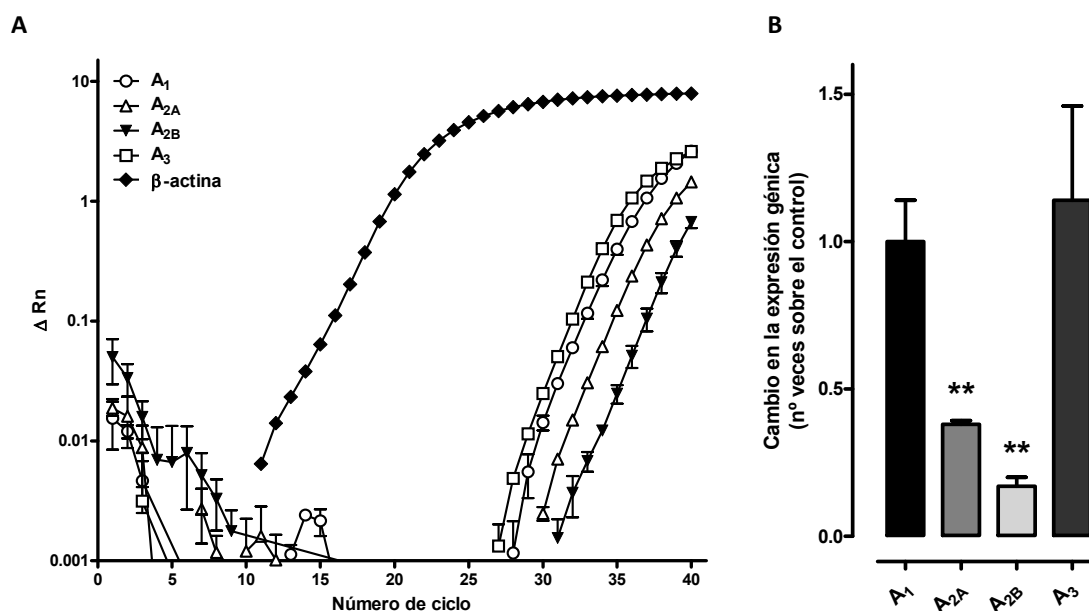


Figura 2: Cuantificación por PCR a tiempo real de la expresión de receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 . a Curvas de amplificación obtenidas usando los cebadores y reactivos específicos por PCR a tiempo real. ΔRn es la señal obtenida normalizada frente a la emisión de referencia pasiva (ROX) menos la línea base establecida en los primeros ciclos de reacción (convencionalmente del 3 al 15). b Los valores fueron normalizados usando la β actina como control interno y expresados en función de la expresión relativa de A_1 . Se presentan las medias \pm SEM de tres experimentos diferentes en los cuales se emplearon preparaciones de ADNc distintas. ** $p < 0.01$ significativamente diferente frente a la expresión relativa de A_1 .

Los parámetros cinéticos obtenidos en estos experimentos fueron: para las membranas una K_D de $4,7 \pm 0,6$ nM y una B_{max} de $74,3 \pm 7,9$ fmol/mg proteína (panel A) y para células intactas se obtuvo una K_D de $16,5 \pm 1,3$ nM y una B_{max} de $358,9 \pm 52,4$ fmol/mg proteína (panel B).

Para confirmar la selectividad de ZM241385 por los receptores A_{2A} se realizaron curvas de competición en las que se emplearon CGS 21680 (agonista de A_{2A}), PSB 1115 (antagonista de A_{2B}) y CPA (agonista de A_1) a las concentraciones indicadas para intentar desplazar la unión de [3H]ZM241385 que se encontraba a una concentración de 15 nM en células C6 intactas (panel C). Como se muestra, sólo el CGS 21680, agonista de A_{2A} , fue capaz de desplazar la unión del radioligando a los receptores celulares, obteniéndose una IC_{50} de 4,2 nM. Sin embargo, el CPA y el PSB 1115, selectivos para A_1 y A_{2B} respectivamente, fueron incapaces de desplazar la unión de [3H]ZM241385, confirmando así la selectividad de este ligando por los receptores A_{2A} en células C6.

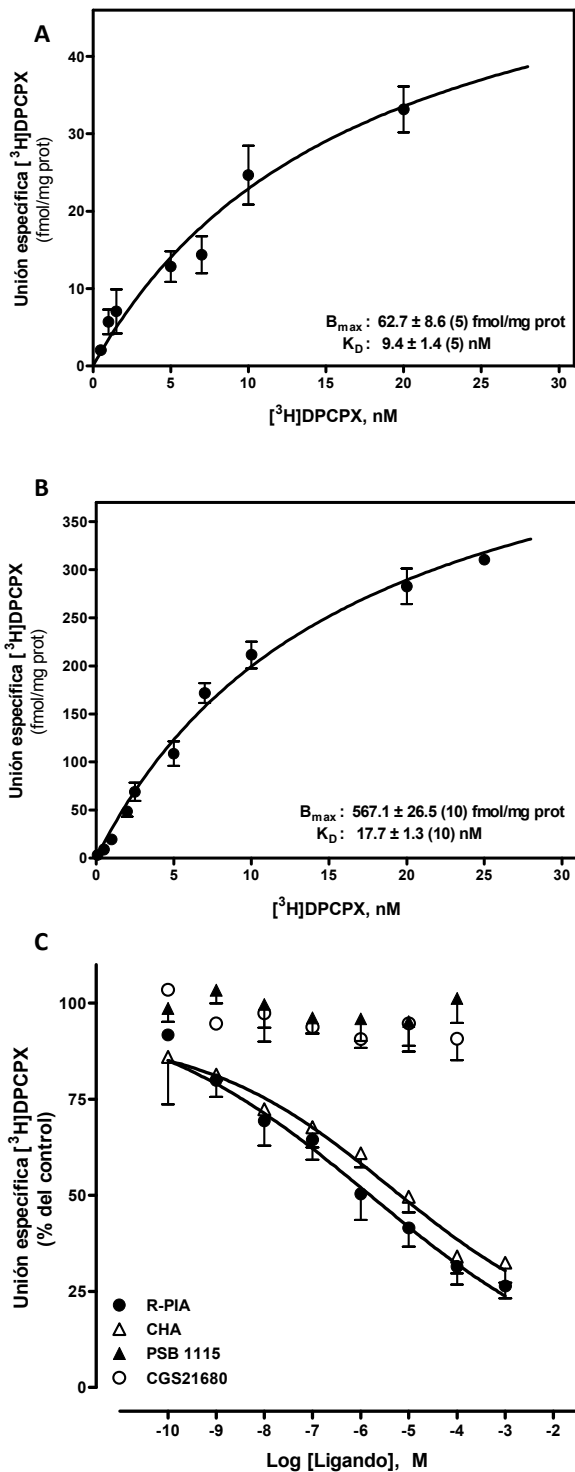


Figura 3: Unión específica de [^3H]DPCPX a membranas y a células intactas. Los ensayos fueron realizados en membranas plasmáticas (A) y en células intactas (B). Los datos obtenidos se muestran como media \pm SEM (n). (C) Células C6 se incubaron con concentraciones crecientes (10^{-9} a 10^{-3} M) de ligandos y con [^3H]DPCPX 15 nM. Se muestra la unión obtenida con respecto al control. Los datos representan la media \pm SEM de 3 a 6 experimentos llevados a cabo por duplicado.

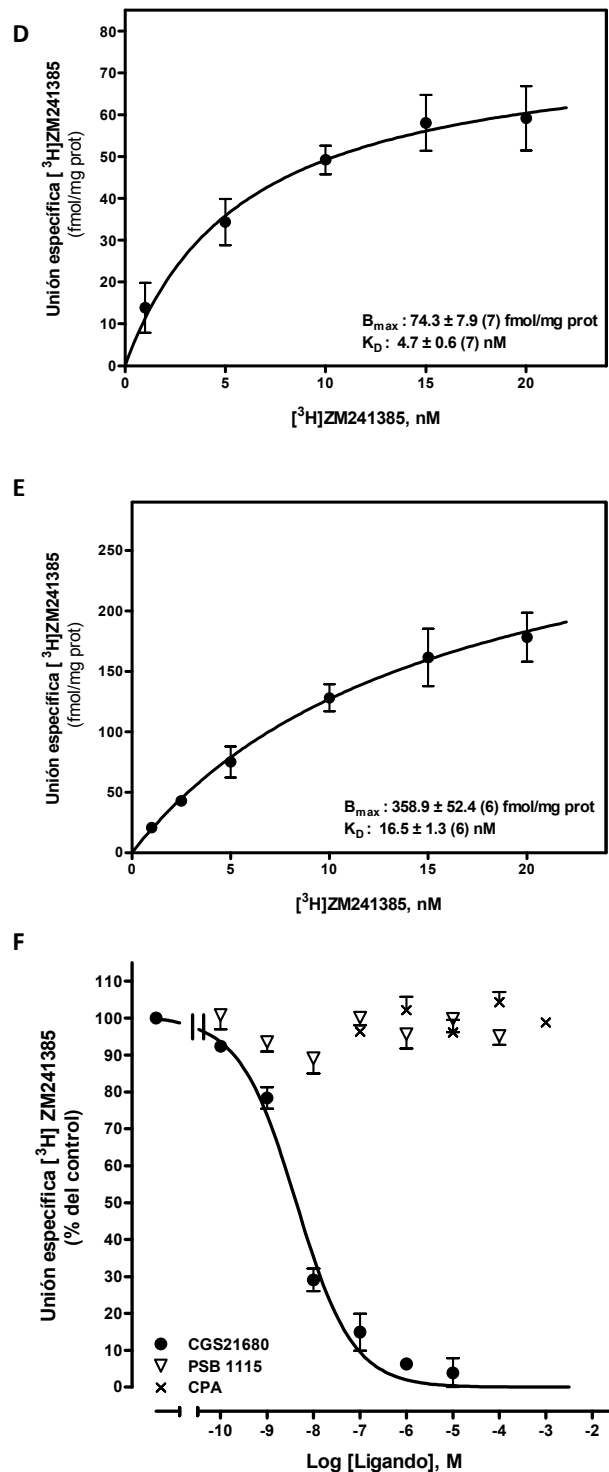


Figura 4: Unión específica de [^3H]ZM241385 a membranas y a células intactas. Los ensayos fueron realizados en membranas plasmáticas (A) y en células intactas (B). Los datos obtenidos se muestran como media \pm SEM (n). (C) Células C6 se incubaron con concentraciones crecientes (10^{-9} a 10^{-3} M) de ligandos y con [^3H]ZM241385 15 nM. Se muestra la unión obtenida con respecto al control. Los datos representan la media \pm SEM de 3 a 6 experimentos llevados a cabo por duplicado.

Está ampliamente descrita la participación de proteínas con actividad GTPasa de manera inhibidora (G_i) en la ruta de transducción de señales mediada por el receptor A_1 . Con el fin de estudiar los subtipos de proteínas G_i implicadas en este proceso en las células C6 se realizaron ensayos de *Western blot*, así como de RT-PCR con el fin de caracterizar este sistema. En la Figura 5, panel A, se muestran los resultados de los *Western blots* realizados empleando anticuerpos específicos para las subunidad α de las proteínas G_{i1-2} y G_{i3} . Como se observa en el panel B de la Figura 5, se detectó, mediante RT-PCR, la presencia del ARNm que codifica la subunidad α de los subtipos 2 y 3 pero no se obtuvo el fragmento correspondiente a la amplificación del subtipo 1, indicando que sólo los subtipos 2 y 3 de proteínas αG_i son los responsables del acoplamiento negativo del receptor A_1 a la enzima adenilato ciclasa.

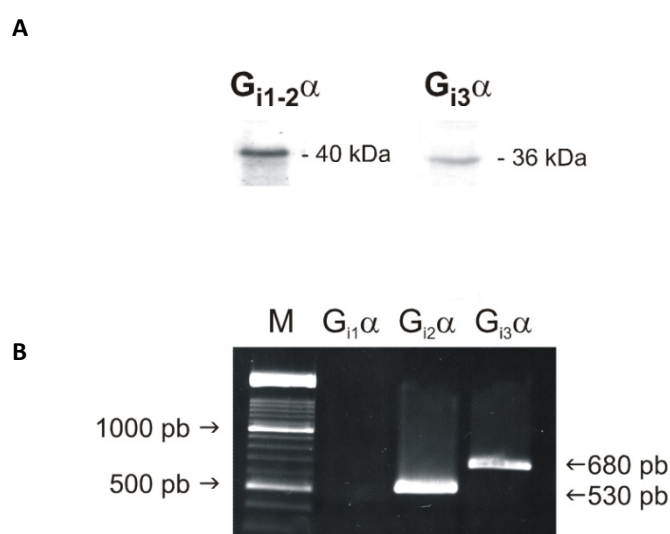


Figura 5: Detección de las proteínas G_i en células C6. A, la presencia de las proteínas αG_{i1-2} y αG_{i3} fue detectada por Western blot. B, ensayo representativo de RT-PCR por el que se detectó la presencia de los ARNm de αG_{i2} , αG_{i3} , se marcan los tamaños de los fragmentos obtenidos (M: marcador de peso molecular, escala de 100 pb)

Por otro lado, mediante ensayos de competición, se demostró que el receptor A_1 estaba acoplado a una proteína G sensible a la toxina extraída de *Bordetella pertussis* (PTX). Así, se presenta en la Figura 6 el desplazamiento en la unión del radioligando [3H]DPCPX en células intactas cuando las células se pre-incubaban con PTX o con Gpp(NH)p (Guanililimido difosfato), un análogo no hidrolizable del GTP, obteniéndose en ambos casos un desplazamiento de la curva de competición hacia la derecha, es decir, ambos tratamientos disminuían la afinidad del receptor por su ligando.

Como se ha expuesto en la *Introducción*, la ruta de señalización mejor conocida para los receptores de adenosina es su capacidad de modular la actividad adenilato ciclasa, siendo inhibidores de dicha actividad los receptores A_1 y activadores los A_2 . Con el fin de comprobar la integridad del sistema “receptor - efector - segundo mensajero”, se realizaron medidas de la actividad de la enzima adenilato ciclasa al tiempo que se estimulaban los mencionados receptores de adenosina.

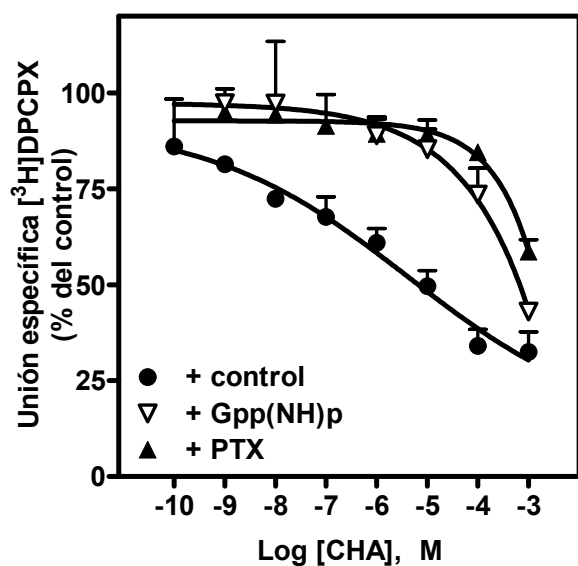


Figura 6: Los receptores A_1 están acoplados a una proteína sensible a PTX. La incubación de las células C6 con 300 ng/mL de toxina pertúsica (PTX) antes del ensayo de unión de radioligando desplazó hacia la derecha la curva de competición del CHA (la IC_{50} varió de 4,2 μ M a > 1 mM) en células intactas. Los datos representados son la media \pm SEM de tras experimentos realizados por triplicado.

En el caso de las células C6, tal y como se muestra en la Figura 7, panel A, se encontró una actividad adenilato ciclasa estimulada por forskolina y GTP de una manera dependiente de la concentración. Para los receptores A_1 , como se observa en el panel B de la misma Figura, se detectó un efecto inhibitor del ligando CHA, mediado por el receptor A_1 , sobre la actividad adenilato ciclasa estimulada con forskolina y GTP. Por último, se demostró (panel C) que este efecto inhibitor del receptor A_1 sobre la enzima AC se producía mediante una proteína sensible a la toxina pertúsica, confirmando así el acoplamiento A_1 /AC a través de una proteína G_i .

Además, tal y como se muestra a continuación, se estudió la funcionalidad de la vía de transducción principal para los receptores A_{2A} y A_{2B} , esto es, la activación de la enzima adenilato ciclasa. En este caso, los ensayos consistieron en curvas de estimulación de la actividad AC por CGS 21680, agonista específico de los receptores A_{2A} , y NECA, agonista genérico de los receptores A_2 . Como se observa en la Figura 8, panel A, el CGS 21680 ejercía un efecto estimulador sobre la actividad AC y este efecto era dependiente de la concentración.

Por otro lado, como se muestra en el panel B, dicho efecto era bloqueado mediante el empleo del antagonista específico del receptor A_{2A} ZM241385.

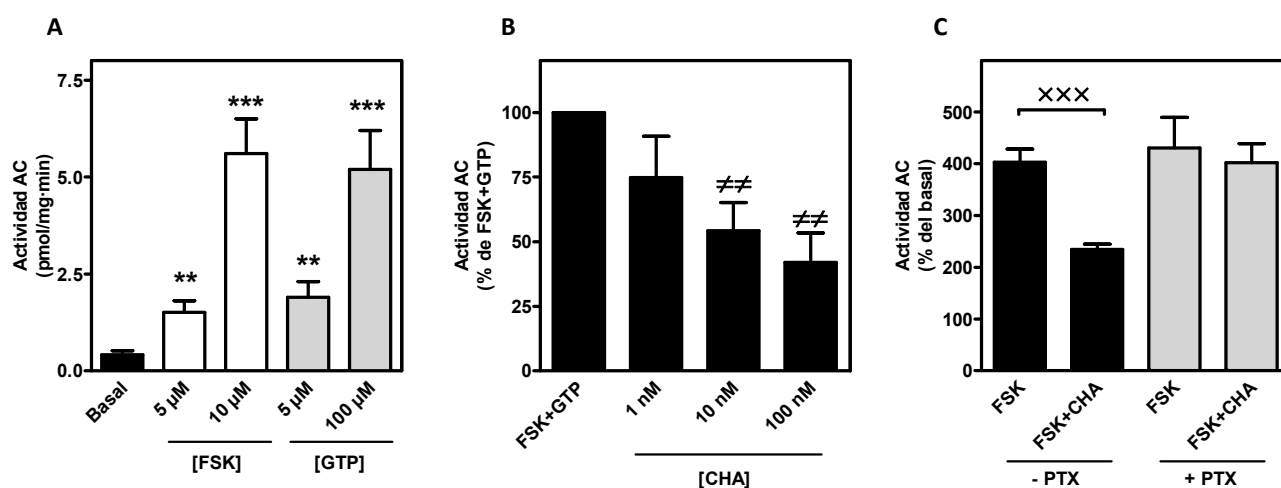


Figura 7: Actividad AC en células C6. A, 10-20 µg de membranas plasmáticas fueron incubadas con las concentraciones indicadas de forskolina (FSK) y GTP. B, las membranas fueron incubadas con forskolina 10 µM y GTP 5 µM en ausencia y presencia de distintas concentraciones de CHA. C, la incubación de células intactas con 300 ng/mL de PTX eliminaba la capacidad inhibitoria de CHA 1 mM. La actividad basal en células tratadas con PTX ($1,52 \pm 0,13$ pmol/mg·min) no difería de la observada en células controles ($1,2 \pm 0,1$ pmol/mg·min). En todos los casos, el AMPc formado se midió siguiendo los protocolos del apartado *Métodos*. Los datos son las medias \pm SEM de tres experimentos realizados por triplicado. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, significativamente diferente de la actividad AC basal en membranas ($0,42 \pm 0,10$ pmol/mg·min). # $p < 0,01$, significativamente diferente del valor estimulado con forskolina y GTP. xxx $p < 0,001$, significativamente diferente del correspondiente valor estimulado con forskolina.

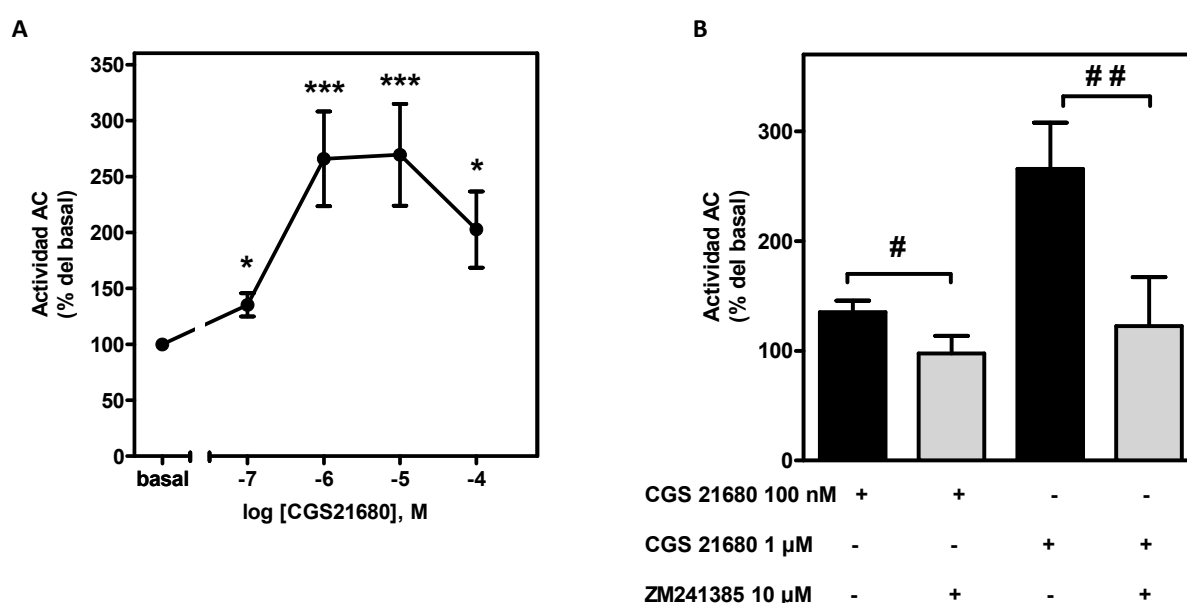


Figura 8: Efecto de CGS 21680 en la actividad AC en células C6 intactas. A, las células se incubaron en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de este agonista de los receptores A_{2A} durante el ensayo de actividad AC. B, el empleo de ZM241385, antagonista de estos receptores, bloqueaba el efecto de CGS 21680. Los datos son las medias \pm SEM de 6 experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$, significativamente diferente de la actividad AC basal. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, significativamente diferente del correspondiente valor estimulado con CGS 21680.

En cuanto a los experimentos en los que se empleó el ligando NECA, como se expone en la Figura 9, panel A, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con CGS 21680, es decir NECA era capaz de estimular la actividad AC de forma dependiente de la concentración. Para comprobar la preferencia de este ligando, si existía, por los dos subtipos de receptores de adenosina capaces de estimular la actividad AC se emplearon los antagonistas ZM241385, específico para A_{2A} , y PSB 1115, específico para A_{2B} . Como se observa en el panel B de la mencionada Figura, la estimulación de NECA sobre la actividad AC a las concentraciones ensayadas, es debida a la acción de este ligando sobre el receptor A_{2B} , ya que su efecto es bloqueable por el antagonista PSB 1115 pero no por ZM241385.

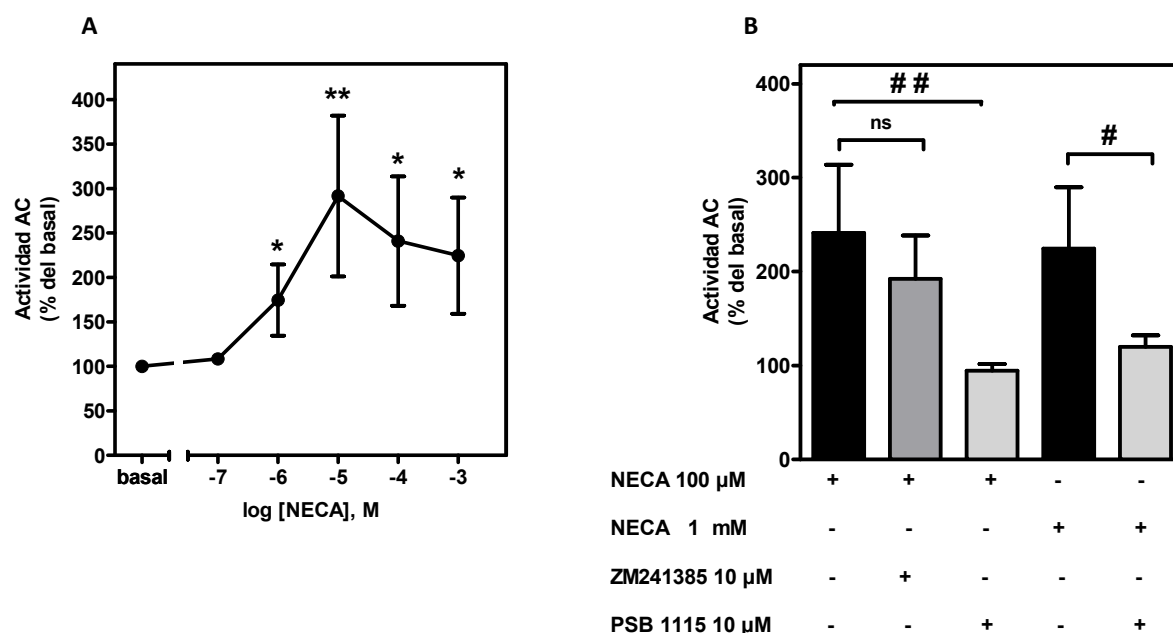


Figura 9: Efecto de NECA en la actividad AC en células C6 intactas. A, las células se incubaron en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de este agonista de los receptores A_2 durante el ensayo de actividad AC. B, el empleo de ZM241385, antagonista de A_{2A} , no bloqueaba el efecto de NECA, mientras que PSB 1115, antagonista de A_{2B} , sí lo hacía. Los datos son las medias \pm SEM de 5 experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, significativamente diferente de la actividad AC basal. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, significativamente diferente del correspondiente valor estimulado con NECA. ns, no significativo.

En este caso también se comprobó que la activación de la AC vía receptores A_2 era mediada por una proteína G_s . En el panel A de la Figura 10, se muestra la inmunodetección por *Western blot* de las dos isoformas de la proteína G_{α_s} . En cuanto a lo que a la funcionalidad del sistema se refiere, se estimularon membranas plasmáticas aisladas con los agonistas antes empleados en presencia o ausencia de un anticuerpo específico para la subunidad G_{α_s} . Como se muestra en el panel B de la misma figura, el efecto estimulador de la formación de AMPc observado a través de los receptores A_2 se producía vía proteína G_{α_s} .

Los experimentos expuestos en este apartado se recogen en la publicación “*Endogenous Expression of Adenosine A_1 , A_2 and A_3 Receptors in Rat C6 Glioma Cells*” (2007) *Neurochem Res* **32**:1056–1070.

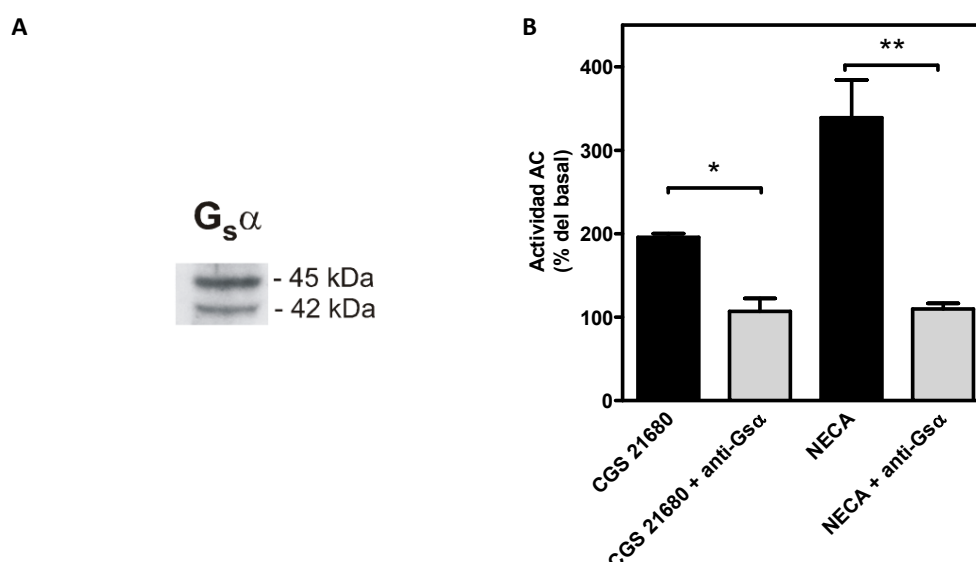


Figura 10: Los receptores A_2 estimulan la actividad AC a través de una proteína αG_s . A, detección por *Western blot* de las dos isoformas de la proteína αG_s , se indican los pesos moleculares de las bandas detectadas. B, la incubación de membranas plasmáticas con un anticuerpo anti- αG_s (1:100) 30 minutos antes del ensayo de actividad enzimática bloqueaba los efectos estimuladores sobre la actividad AC observados al aplicar CGS 21680 1 μM y NECA 100 μM . Los datos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, significativamente diferente del correspondiente valor estimulado con agonista.

IV.2 Excitotoxicidad inducida por Glutamato.

IV.2.1 En cultivos primarios de neuronas de corteza.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC. En la actualidad se ha relacionado con procesos fisiológicos tan importantes como el aprendizaje o la memoria o como la dirección de las conexiones nerviosas durante el desarrollo. No obstante, cuando es liberado de forma incontrolada ocurren procesos de muerte celular como consecuencia de la activación de los receptores NMDA y la entrada masiva de calcio al interior celular. Este proceso cobra importancia desde que se ha visto relacionado con varias enfermedades neurodegenerativas, algunas de ellas estudiadas por nuestro grupo de investigación (Rodríguez y col., 2006; Albasanz y col., 2005).

Dada la capacidad de los receptores metabotrópicos de glutamato de controlar los niveles de calcio intracelular o de modular la actividad de determinados canales iónicos, resultan dianas terapéuticas potenciales para la curación/atenuación de ciertas alteraciones neuroquímicas de las mencionadas enfermedades.

Por otro lado, los receptores de adenosina están también relacionados con el control de la liberación de glutamato, lo que les convierte también en dianas potenciales.

Por este motivo se estudió en el presente apartado los procesos de modulación que sufren los receptores metabotrópicos de glutamato y los receptores de adenosina en condiciones de exposición tóxica a glutamato.

a) Efecto en la viabilidad.

Según Attucci y colaboradores (Attucci y col., 2002), en cultivos hipocampales la concentración de glutamato estimada para inducir un 50% de muerte neuronal en cultivos de entre 21 y 28 DIV tras 24 horas de exposición era de entre 5 y 30 μM . Por este motivo, para la realización de estos experimentos se emplearon dos concentraciones de L-Glu diferentes, 1 y 100 μM , que aseguraran una toxicidad moderada y una toxicidad más elevada, a dos tiempos de exposición también diferentes. La viabilidad se midió por el test basado en MTT y los resultados se exponen en la Figura 11.

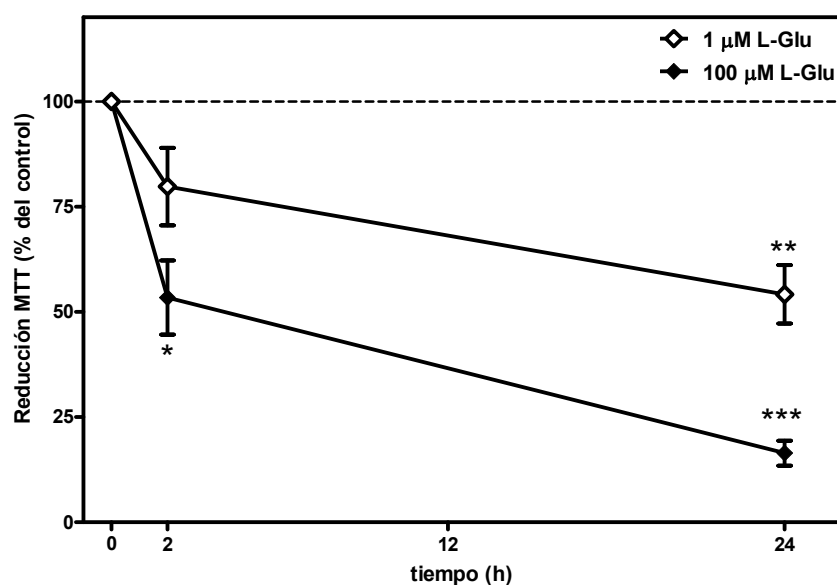


Figura 11: La exposición a L-Glu disminuye la viabilidad celular. Neuronas corticales se expusieron a L-Glu 1 μM o 100 μM durante 2 o 24 horas. Transcurrido este tiempo se midió la viabilidad celular mediante el test basado en MTT. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por triplicado, expresados porcentualmente con respecto a la viabilidad de las células controles. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente respecto al control.

Como se observa, sólo la exposición a L-Glu 1 μM durante dos horas no produce resultados estadísticamente significativos, a pesar de observarse una disminución promedio de un 20% en la viabilidad celular ($p = 0,288$). Sin embargo, la exposición a esta misma cantidad de glutamato durante un periodo más prolongado de tiempo conlleva una disminución en la viabilidad de un 46% con respecto a la situación control ($p < 0,01$).

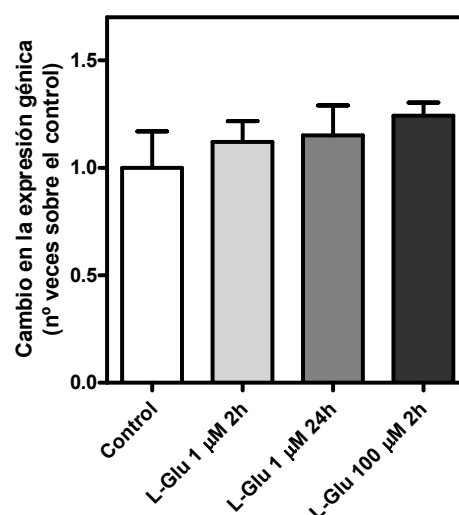
Por otro lado, se observa que la exposición a L-Glu 100 μM es un proceso mucho más tóxico, tal y como cabría esperar, de hecho, tras 2 horas de aplicación ya se habían perdido el 47% de las neuronas corticales del

cultivo ($p < 0,05$), mientras que tras 24 h de exposición sólo quedaban un 16% de neuronas supervivientes ($p < 0,001$).

Estos resultados confirman el hecho experimental de que la exposición a elevadas cantidades de glutamato induce toxicidad en cultivos celulares, describiéndose además un modelo de excitotoxicidad *in vitro* dependiente de la concentración y el tiempo de exposición a L-Glu.

Por otro lado se midió por PCR a tiempo real si esta exposición a L-Glu desencadenaba la activación génica de la caspasa 3. Como se expone en la Figura 12, se aprecia un incremento parcial de la expresión de caspasa 3. Sin embargo, ni en el caso más extremo de exposición a L-Glu empleado en estos ensayos, donde la expresión aumentaba un 24%, se consiguen valores estadísticamente significativos ($p = 0,225$), hecho que apunta a que la muerte celular producida por la exposición excesiva a L-Glu ocurre por necrosis y no por apoptosis.

Figura 12: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión de caspasa 3. Neuronas corticales fueron expuestas a L-Glu 1 μM durante 2 o 24 horas, L-Glu 100 μM durante 2 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando una sonda específica para el gen codificante para la caspasa 3. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras.



b) Receptores metabotrópicos de Glutamato.

La determinación de los parámetros cinéticos de los receptores metabotrópicos de glutamato, estudiados por ensayos de unión de radioligando, tanto en neuronas corticales controles como en las expuestas a toxicidad *in vitro* se exponen en la Figura 13.

En cuanto al número total de receptores, panel A, se aprecia que el L-Glu produce una disminución de los receptores metabotrópicos que varía en función tanto de la concentración del agente como del tiempo de exposición del mismo. En el caso de la exposición a L-Glu 1 μM , se observa que tras 2 horas de exposición se detecta una disminución de la cantidad de receptores de un 14%. Sin embargo, esta disminución no resulta significativa según el test estadístico empleado. Por otro lado, si la exposición se prolonga hasta las 24 horas la disminución en el número de receptores alcanza el 51%, dato que sí resulta estadísticamente significativo ($p < 0,001$).

En el caso de que se empleara L-Glu a 100 μM el número de receptores en la superficie celular también disminuye pero los resultados son todavía más claros. Como se observa, tras 2 horas de exposición el número

total de receptores ha disminuido un 40% ($p<0,001$), mientras que si la exposición se prolonga hasta las 24 horas, un 95% de los receptores metabotrópicos desaparece de la superficie celular ($p<0,001$).

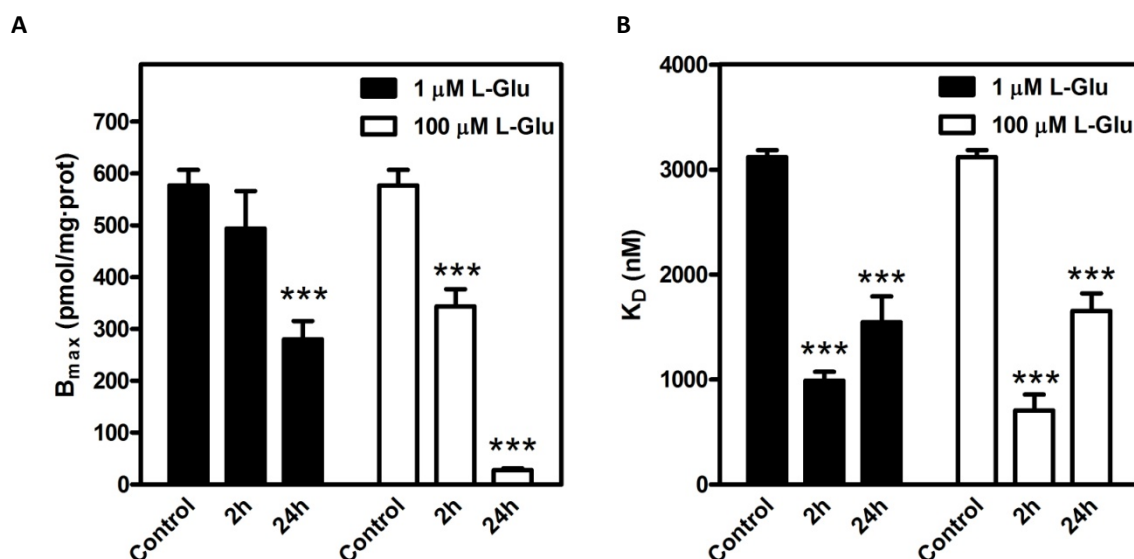


Figura 13: La exposición a L-Glu modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular. Neuronas corticales se expusieron a L-Glu 1 μ M o 100 μ M durante 2 o 24 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando L-[³H]Glu. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. *** $p<0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

En cuanto a la afinidad de los receptores, panel B, se aprecia un efecto más marcado que en el número de receptores, ya que, en este caso, todos los resultados obtenidos son estadísticamente significativos (todos $p<0,001$), observándose una disminución en la constante que implica un aumento de la afinidad del receptor por su ligando. En el caso de la concentración más baja se observa un efecto bifásico, a tiempos cortos de exposición la afinidad de los receptores por su ligando aumentaba en un 68%, mientras que si el tiempo de exposición se prolongaba el aumento de la afinidad sólo llegaba hasta el 50% con respecto a la situación control. En el caso de la concentración de 100 μ M, el perfil observado es el mismo, mientras que a 2 horas la disminución de la K_D era de un 77%, tras 24 horas de exposición su valor sólo descendía hasta el 47% del valor inicial.

Por otro lado, la comparación estadística de los datos obtenidos para cada concentración muestra que, excepto en la comparación de las afinidades obtenidas empleando L-Glu 1 μ M ($p=0,059$) los resultados obtenidos a distintos tiempos de exposición son estadísticamente diferentes entre sí (al menos $p<0,005$).

Estos resultados indican que la exposición a L-Glu en neuronas corticales produce una regulación a la baja de los receptores metabotrópicos de glutamato, que conlleva un aumento de la afinidad de los mismos por su ligando.

A continuación se expone un resumen (Tabla 6) de los datos cinéticos obtenidos en estos experimentos.

	Control	L-Glu 1 μ M 2h	L-Glu 1 μ M 24h	L-Glu 100 μ M 2h	L-Glu 100 μ M 24h
B_{máx} (pmol/mg)	577,2 \pm 29,4	493,8 \pm 72,6	279,9 \pm 35,6	343,8 \pm 32,5	27,7 \pm 3,5
			***	***	***
K_D (nM)	3117,9 \pm 68,7	988,4 \pm 84,2	1546,8 \pm 244,5	704,9 \pm 152,3	1653,7 \pm 167,8
		***	***	***	***

Tabla 6: Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos en neuronas corticales expuestas a L-Glu. *** p<0,001 significativamente diferente respecto al correspondiente control.

El siguiente paso fue comprobar de manera más específica la regulación sufrida por esta familia de receptores, para ello se emplearon los anticuerpos específicos disponibles para cada subtipo, tal y como se describe en *Métodos*. La cuantificación de la fluorescencia obtenida, así como del análisis estadístico de los datos se muestra en la Figura 14, mientras que algunas micrografías representativas de las imágenes obtenidas para cada uno de los anticuerpos empleados por cada condición experimental se exponen en la Figura 15.

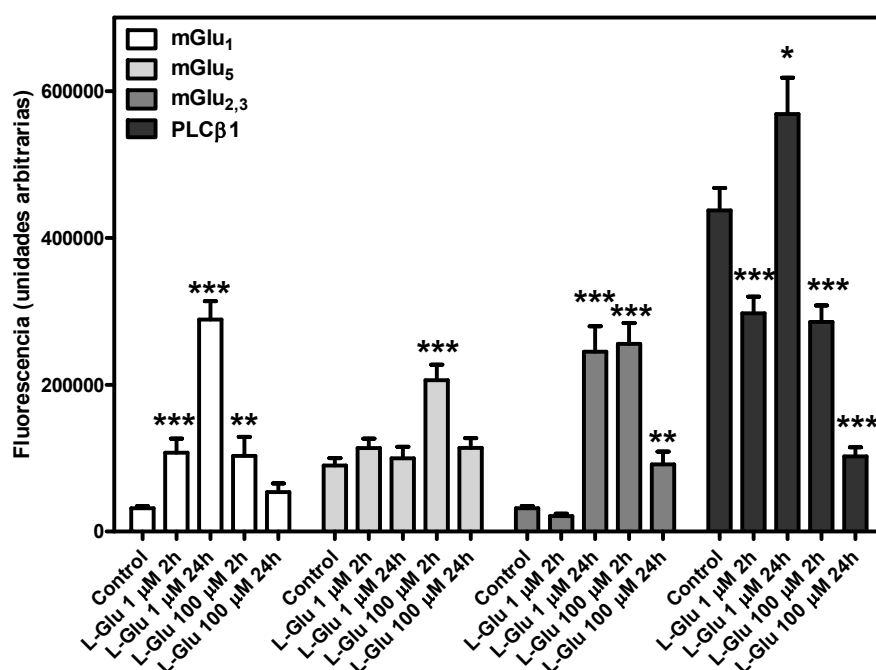


Figura 14: La exposición a L-Glu modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular. Diagrama de barras que resume los resultados expuestos en la Figura 14. Las cuantificaciones se realizaron usando el *software* LAS AF empleando un mínimo de 30 campos por condición experimental. Se exponen las medias \pm SEM obtenidas para cada condición experimental. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 significativamente diferente con respecto al control.

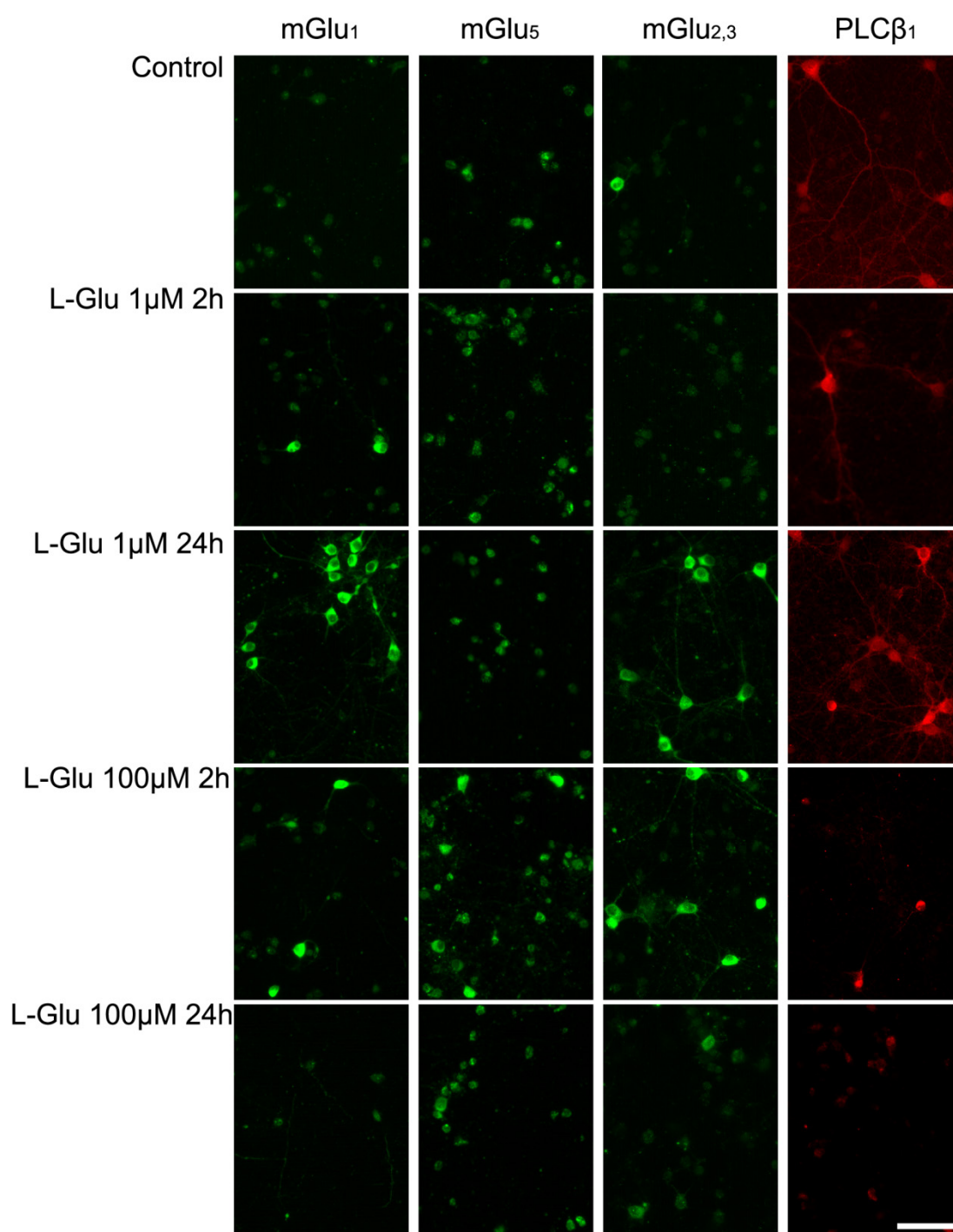


Figura 15: Inmunodetección de mGlu y PLCβ₁ tras la exposición a L-Glu. Micrografías representativas de los resultados obtenidos tras los experimentos de inmunofluorescencia al emplear los anticuerpos para mGlu₁, mGlu₅, mGlu_{2,3} y PLCβ₁ en las distintas condiciones experimentales. La barra representa 62 μm.

A continuación se expone un resumen (Tabla 7) que recoge los principales hallazgos observados en esta serie de experimentos.

	mGlu ₁	mGlu ₅	mGlu _{2,3}	PLCβ ₁
L-Glu 1μM 2h	↑***	≈	≈	↓***
L-Glu 1μM 24h	↑***	≈	↑***	↑*
L-Glu 100μM 2h	↑**	↑***	↑***	↓***
L-Glu 100μM 24h	≈	≈	↑**	↓***

Tabla 7: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de inmunofluorescencia en neuronas corticales expuestas a L-Glu. Se muestra el sentido de la variación observada con respecto al control mediante flechas: ↑ aumenta; ↓ disminuye. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente respecto al correspondiente control.

Como se observa, la regulación de cada uno de los subtipos de los receptores metabotrópicos como consecuencia de la exposición a L-Glu parece ser específica para cada subtipo y depende del tiempo y de la cantidad de L-Glu a la que se expongan las neuronas corticales *in vitro*. En el caso del receptor mGlu₁, se observa un aumento significativo de su presencia en la membrana plasmática en todos los casos excepto en la exposición a L-Glu 100 μM durante 24 horas. En el caso de mGlu₅, la modulación es más discreta y sólo se aprecia un aumento significativo de la cantidad de proteína en membrana tras 2 horas de exposición a L-Glu 100 μM. Los últimos receptores estudiados, mGlu_{2,3}, sufren un aumento significativo de su expresión en membrana en todos los casos excepto en la exposición a L-Glu 1 μM durante 2 horas.

Por otro lado, la regulación sufrida por la enzima PLCβ₁ es también compleja, observándose un aumento tras la exposición a L-Glu 1 μM durante 24 horas y disminuciones en la cantidad de proteína en el resto de los casos.

Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión en membrana de los distintos subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato, así como de la cantidad total de la enzima PLC β₁, es compleja y parece no seguir un patrón dependiente de la concentración de L-Glu empleado ni del tiempo de exposición en neuronas corticales *in vitro*.

Dadas las variaciones detectadas en los receptores metabotrópicos de glutamato y en la enzima PLCβ₁, se decidió estudiar si los cambios observados ocurrían como consecuencia de la regulación génica de estas proteínas. Para ello, se realizaron ensayos de PCR a tiempo real en los que se cuantificó la cantidad de ARNm de los receptores mGlu₁ y mGlu₅, así como de la enzima PLCβ₁. En estos ensayos se eliminó la exposición a L-Glu 100 μM durante 24 horas debido a la baja viabilidad observada. Los resultados obtenidos en estos experimentos se exponen en la Figura 16.

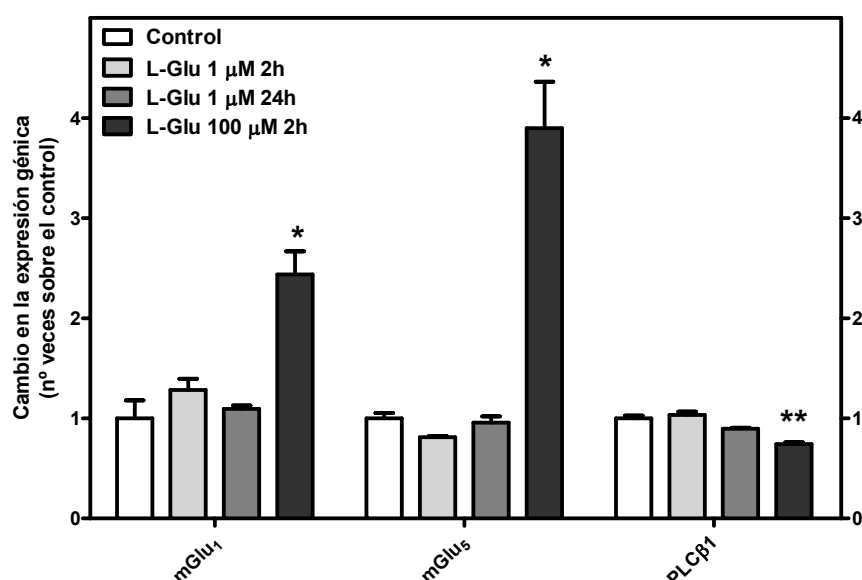


Figura 16: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión génica de mGlu₁, mGlu₅ y PLC β ₁. Neuronas corticales fueron expuestas a L-Glu 1 μ M durante 2 o 24 horas, L-Glu 100 μ M durante 2 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, significativamente diferente con respecto al control.

Como se observa, sólo cuando las neuronas corticales se expusieron a L-Glu 100 μ M durante dos horas se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. En concreto, para el receptor mGlu₁ es en este punto en el que su expresión génica aumentó un 144% ($p < 0,05$). En el caso de mGlu₅ la expresión aumentó un 290% sobre los niveles detectados en condiciones controles ($p < 0,05$). Por último, en el caso de PLC β ₁ se detectó una disminución de un 26% sobre el control.

Estos resultados sugieren que la modulación de la expresión génica de estas proteínas depende de la concentración a la que se exponen las neuronas corticales, de tal modo que el empleo de L-Glu 1 μ M, independientemente del tiempo de exposición, no modula la expresión génica de las proteínas estudiadas, sin embargo, el empleo de L-Glu 100 μ M sólo durante dos horas es suficiente para observar variaciones significativas en la expresión génica.

Dadas las variaciones observadas en los receptores metabotrópicos del grupo I, así como de la isoforma de la enzima a la que están acoplados principalmente, se procedió a realizar un estudio del efecto de la exposición a L-Glu sobre la actividad PLC. Para ello se eligió la condición de exposición a L-Glu 100 μ M durante 2 horas ya que era en la que más cambios se detectaban en lo que a la cantidad de receptores en la membrana se refiere.

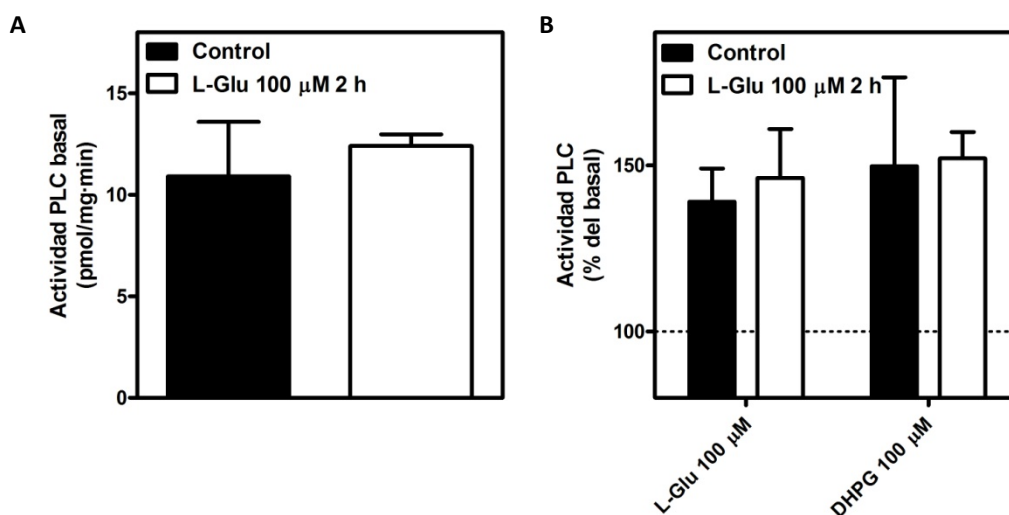


Figura 17: La exposición a L-Glu no varía la actividad PLC. Neuronas corticales fueron expuestas o no a L-Glu 100 μM durante 2 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de IP₃. Se estudió el efecto de la exposición a L-Glu sobre la actividad PLC basal (panel A), así como su efecto sobre la funcionalidad del sistema estimulado por agonistas del grupo I de los receptores metabotrópicos de glutamato (panel B). Los datos expuestos son las medias ± SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos.

Como se expone en la Figura 17, panel A, la exposición a L-Glu no produce cambios significativos sobre la actividad PLC basal en relación a la actividad detectada en neuronas corticales controles (Control: 10,91 ± 2,69; Tratada: 12,41 ± 0,57 pmol/mg-min). En el panel B se muestra que, tanto L-Glu 100 μM como (S)-DHPG son capaces de estimular la hidrólisis de fosfatidil-inositoles en células controles, así como en las tratadas. Sin embargo, no se observan diferencias significativas al comparar los datos obtenidos en ambas situaciones. Todos los datos expuestos son significativamente diferentes (al menos $p < 0,05$) con respecto a la actividad basal de cada grupo (L-Glu: Control: 139,06 ± 9,96; Tratada: 146,16 ± 14,70%; (S)-DHPG: Control: 149,69 ± 26,80; Tratada: 152,13 ± 7,87%).

Estos resultados sugieren que, a pesar del aumento observado en los receptores metabotrópicos del grupo I en estas condiciones, la disminución observada en la PLCβ₁ es suficiente para que la actividad enzimática PLC medida no varíe en su conjunto.

Por último, se comprobó la capacidad de los receptores metabotrópicos de los grupos II y III para transducir la señal a través del sistema enzimático al que están principalmente acoplados, la inhibición de la adenilato ciclasa. Estos experimentos se realizaron exponiendo las neuronas corticales a L-Glu 100 μM durante 2 horas, dado que es la condición a la que se observaban mayores niveles de los receptores pertenecientes al grupo II en la membrana plasmática de estas células. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 18.

Como se observa en el panel A, la exposición a L-Glu 100 μM durante 2 horas no afecta a la actividad basal de la AC (Control: 0,94 ± 0,27; Tratada: 1,00 ± 0,53 pmol/mg-min). En el panel B se expone la capacidad de (2R,4R)-APDC, agonista de los receptores del grupo II, y de L-AP4, agonista de los receptores del grupo III, de inhibir la actividad AC ((2R,4R)-APDC: Control: 58,24 ± 10,27; Tratada: 70,53 ± 6,37%; L-AP4: Control: 50,22 ± 3,70; Tratada: 76,94 ± 7,47%, $p < 0,05$). En todos los casos los datos obtenidos son significativamente diferentes

del basal (al menos $p < 0,05$), pero sólo se observaron diferencias significativas tras el empleo del agonista del grupo III, obteniéndose una menor inhibición de la actividad AC en células expuestas a L-Glu que en células controles. Estos resultados sugieren que, en estas condiciones, los receptores metabotrópicos del grupo III podrían estar regulados a la baja, ya que el principal sistema de transducción de señales al que están acoplados resulta alterado como consecuencia de la excitotoxicidad *in vitro*, mientras que en el caso del grupo II no se observan diferencias.

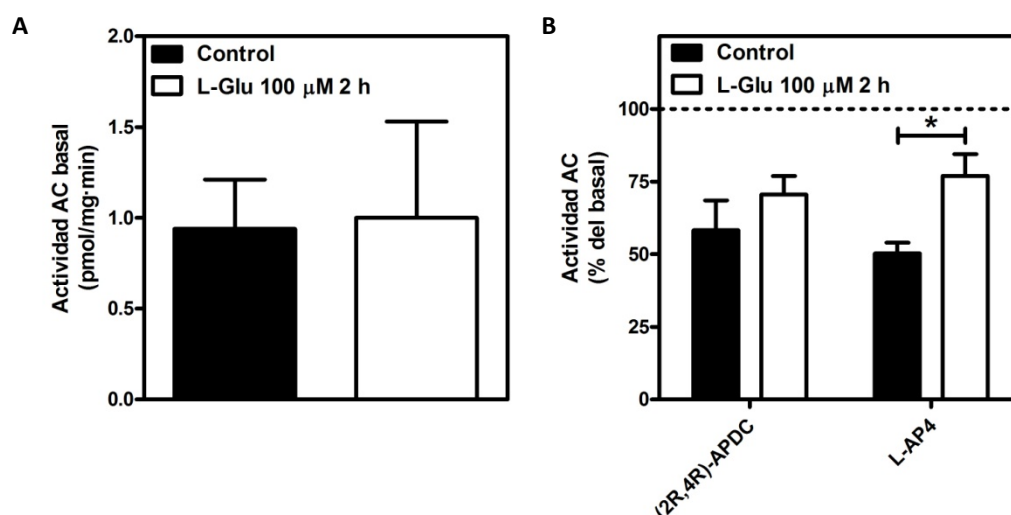


Figura 18: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la actividad AC. Neuronas corticales fueron expuestas o no a L-Glu 100 µM durante 2 antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de AMPc. Se estudió el efecto de la exposición a L-Glutamato sobre la actividad AC basal (panel A), así como su efecto sobre la funcionalidad del sistema inhibido por un agonista del grupo II de los receptores metabotrópicos de glutamato, (2R,4R)-APDC, y por un agonista del grupo III, L-AP4 (panel B). Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. * $p < 0,05$ significativamente diferente de su correspondiente control.

c) Receptores de adenosina.

Como se ha mencionado en la *Introducción*, está descrito con anterioridad en la bibliografía, incluso por este mismo Grupo de investigación, la existencia de trans-modulación entre los receptores metabotrópicos de glutamato y los receptores de Adenosina. Por este motivo se extendió el estudio de los procesos desarrollados a nivel molecular tras una exposición a glutamato al sistema de los receptores de Adenosina en neuronas corticales en cultivo.

Con el fin de cuantificar la densidad de los receptores a nivel de la superficie celular se recurrió al ensayo de unión de radioligando, empleando, de nuevo, [3 H]DPCPX como antagonista específico para el receptor A_1 . Como se observa en la Figura 19 el tratamiento con L-Glu 100 µM durante 2 horas prácticamente duplicaba el número de receptores en la superficie celular desplazando además la K_D hacia valores más elevados de radioligando. Como se puede observar, tanto el aumento en el número de receptores (85% de incremento con respecto al control) como el aumento en la K_D (más de cuatro veces con respecto al control) resultaban significativos cuando se sometían al test estadístico de Student. Estos resultados sugieren que la

exposición de las neuronas corticales a glutamato en estas condiciones modula los receptores A₁ de adenosina incrementando su presencia en la membrana celular y disminuyendo la afinidad de los mismos por su ligando.

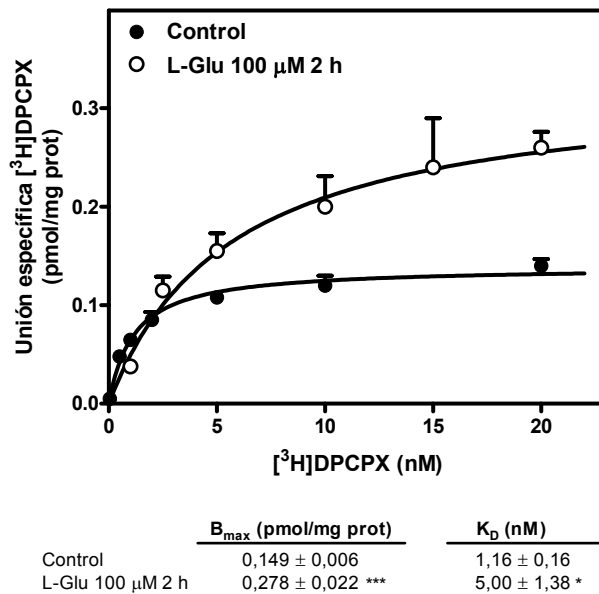


Figura 19: La exposición a L-Glu regula al alza los receptores A₁ (I). Neuronas corticales fueron expuestas o no a L-Glu 100 μ M durante 2 horas antes de realizar los ensayos de unión de radioligando empleando el antagonista específico del receptor A₁ [³H]DPCPX. Los datos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} y K_D , se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

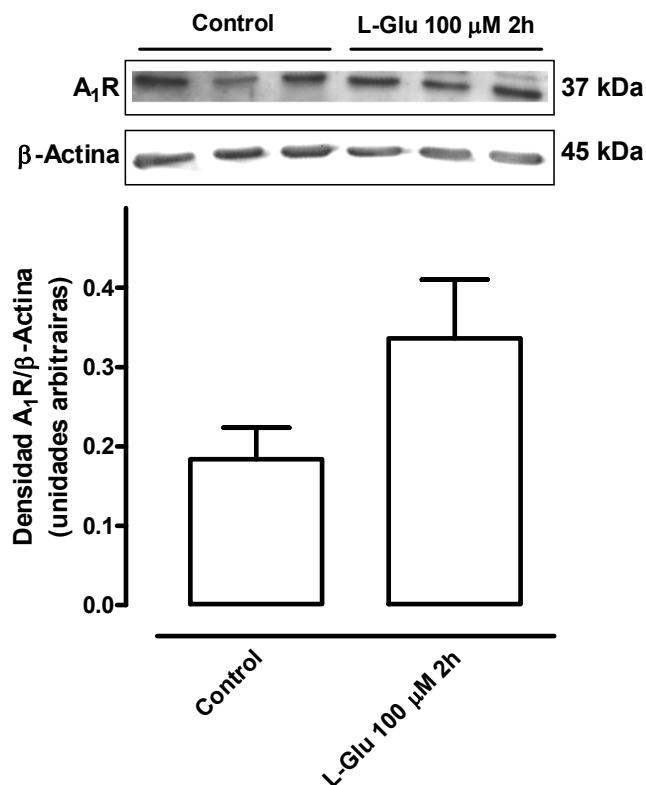


Figura 20: La exposición a L-Glu regula al alza los receptores A₁ (II). Neuronas corticales fueron expuestas o no a L-Glu 100 μ M durante 2 horas antes de realizar aislamientos de membranas plasmáticas por centrifugación diferencial, tal y como se describe en *Métodos*. Se emplearon 30 μ g de cada muestra en la separación electroforética. Tras la inmovilización se emplearon anticuerpos específicos para el receptor A₁ y para la proteína β -actina como control de carga. Se expone en el panel superior una imagen representativa, los pesos moleculares indicados representan la altura de las bandas densitometradas. En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 2 experimentos independientes empleando distintas muestras.

Estos resultados fueron corroborados mediante el empleo de la técnica de *Western blot* (Figura 20). Así, la fracción de membrana plasmática de cultivos primarios de neuronas corticales, fue separada electroforéticamente en condiciones desnaturalizantes y transferida a un soporte sólido, tal y como se describe en *Métodos*. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas tras el proceso de inmunodetección con los

anticuerpos específicos para el receptor A_1 y para el control interno de la β -actina, revelaban un aumento de un 82% en la cantidad de receptor A_1 presente en la membrana plasmática de las células expuestas a glutamato con respecto a la cantidad del mismo receptor presente en las membranas plasmáticas de las células controles. Sin embargo, el aumento descrito por este método no resultó significativo ($p=0,14$), debido probablemente a la menor sensibilidad de este método con respecto del ensayo de unión de radioligandos.

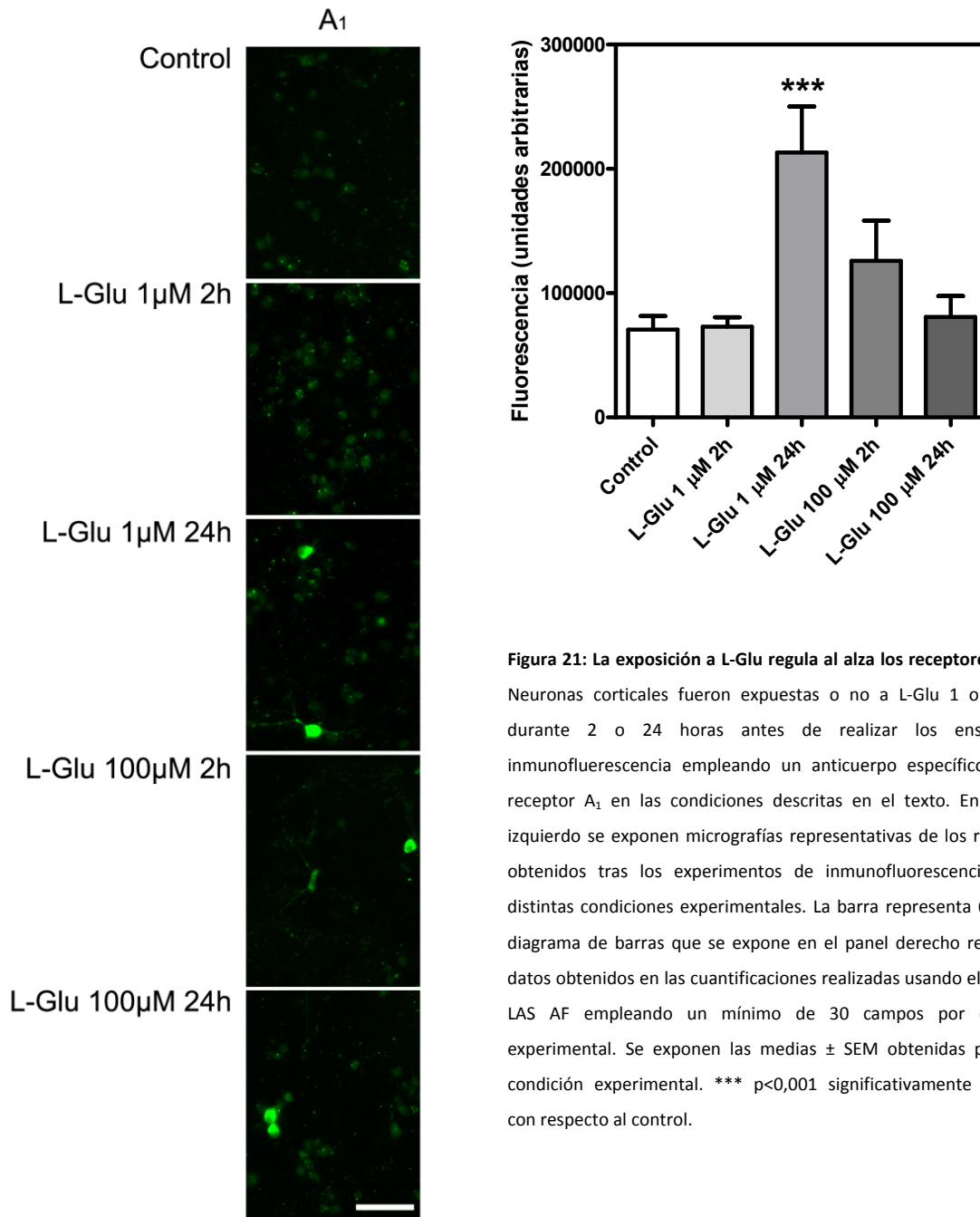


Figura 21: La exposición a L-Glu regula al alza los receptores A_1 (III). Neuronas corticales fueron expuestas o no a L-Glu 1 o 100 μ M durante 2 o 24 horas antes de realizar los ensayos de inmunofluorescencia empleando un anticuerpo específico para el receptor A_1 en las condiciones descritas en el texto. En el panel izquierdo se exponen micrografías representativas de los resultados obtenidos tras los experimentos de inmunofluorescencia en las distintas condiciones experimentales. La barra representa 62 μ m. El diagrama de barras que se expone en el panel derecho resume los datos obtenidos en las cuantificaciones realizadas usando el software LAS AF empleando un mínimo de 30 campos por condición experimental. Se exponen las medias \pm SEM obtenidas para cada condición experimental. *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

Con el fin de ampliar este estudio a distintas condiciones de exposición a L-Glu se recurrió a la técnica de inmunocitoquímica como herramienta sencilla que permitía estudiar el comportamiento del receptor A_1 en distintas situaciones así como cuantificar su variación. De esta manera, el mismo anticuerpo contra el receptor A_1 empleado en *Western blot* fue empleado para las inmunofluorescencias. Dado que el epítipo contra el que

está dirigido este anticuerpo se encuentra situado en la parte del receptor expuesta hacia el exterior de la membrana (aminoácidos 309-326), la fijación con paraformaldehído, tras los correspondientes tratamientos, sin posterior permeabilización nos permitió cuantificar la cantidad de receptor presente en la membrana celular después de haber terminado la inmunocitoquímica. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21, en el panel izquierdo se muestran imágenes representativas de cada una de las condiciones de exposición a L-Glu ensayadas, así como de la condición control. Por su parte en el panel derecho se observan los resultados obtenidos tras las cuantificaciones realizadas con el *software* LAS AF Lite, tal y como se describe en *Métodos*. Como se observa, la exposición a L-Glu produce, en general, un aumento de la fluorescencia observada, esto es un aumento de la cantidad de receptor A_1 presente en la membrana celular. Sin embargo, este aumento sólo es significativo para la exposición a L-Glu 1 μM durante 24 horas ($p < 0,001$, según ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni), en la que el aumento de la intensidad de fluorescencia promedio es de 3 veces, siendo de 1,8 veces para L-Glu 100 μM 2h y de 1,1 veces para L-Glu 100 μM 24h, mientras que para L-Glu 1 μM durante 2 horas prácticamente no hay aumento. Estos resultados sugieren que, en general, la exposición a L-Glu produce un aumento de los receptores A_1 a nivel de la membrana plasmática, corroborando así los resultados obtenidos con anterioridad.

Como se expone en el panel superior de la Figura 22, la exposición de neuronas corticales en cultivo a L-Glu 100 μM durante 2 horas produce un aumento del número total de receptores A_{2A} en la superficie celular. El análisis estadístico de los datos obtenidos en estos ensayos se muestra en el panel inferior de la misma Figura. Como se expone, el aumento observado resulta significativo y se corresponde con un aumento del número de receptores de un 82% con respecto a las células controles. Por otro lado, aunque se observa un ligero aumento de la K_D de estos receptores, lo que conlleva una disminución en la afinidad de los mismos, este aumento no es significativo. Estos resultados sugieren que la exposición a L-Glu en estas condiciones produce un aumento del número de receptores A_{2A} en la membrana plasmática de neuronas corticales en cultivo, sin que ello afecte a la afinidad del receptor por su ligando.

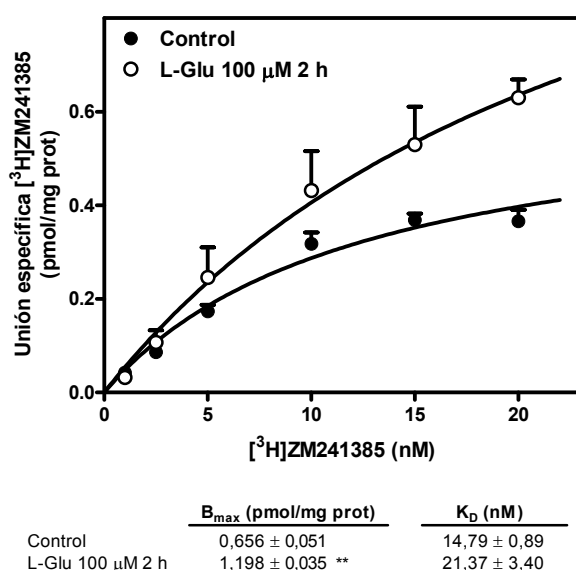


Figura 22: La exposición a L-Glu regula al alza los receptores A_{2A} . Neuronas corticales fueron expuestas o no a L-Glu 100 μM durante 2 horas antes de realizar los ensayos de unión de radioligando empleando el antagonista específico del receptor A_{2A} [^3H]ZM241385. Los datos expuestos en el panel superior son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{\max} y K_D , se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0 y se exponen en el panel inferior. ** $p < 0,01$, significativamente diferente con respecto al control.

Una vez realizado el estudio de los receptores A_1 y A_{2A} de adenosina a nivel de la superficie celular se procedió al estudio de la regulación de la expresión génica de los mismos tras la exposición de las neuronas corticales en cultivo a distintas cantidades de L-Glu, con el fin de comprobar si los cambios detectados eran consecuencia de procesos de regulación de la expresión génica inducidos por este agente. Para ello se recurrió a la técnica de RT-PCR en tiempo real empleando sondas específicas para los genes correspondientes a los receptores A_1 , A_{2A} y A_{2B} . A pesar de que se disponía de una sonda para el gen correspondiente al receptor A_3 de adenosina, se descartó su análisis por PCR debido a la baja expresión de este gen en neuronas corticales.

Con este fin, las neuronas corticales se expusieron a L-Glu 1 μ M durante 2 y 24 horas y a L-Glu 100 μ M durante dos horas, después de los tratamientos se procedió a extraer el ARN total de cada condición. Aunque para el estudio del receptor A_1 por inmunocitoquímica se empleó también la condición L-Glu 100 μ M durante 24 horas, esta condición fue descartada para los estudios de PCR debido a la baja viabilidad celular tras la exposición, lo que disminuía considerablemente el rendimiento de obtención de RNA.

Los resultados obtenidos para estos experimentos se exponen en la Figura 23. Como se observa en la Figura, para el gen codificante para el receptor A_1 ocurre que el tratamiento con L-Glu aumenta la expresión de dicho gen de forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Sin embargo, esta tendencia es sólo significativa en el caso del tratamiento con L-Glu 100 μ M 2h ($p < 0,05$).

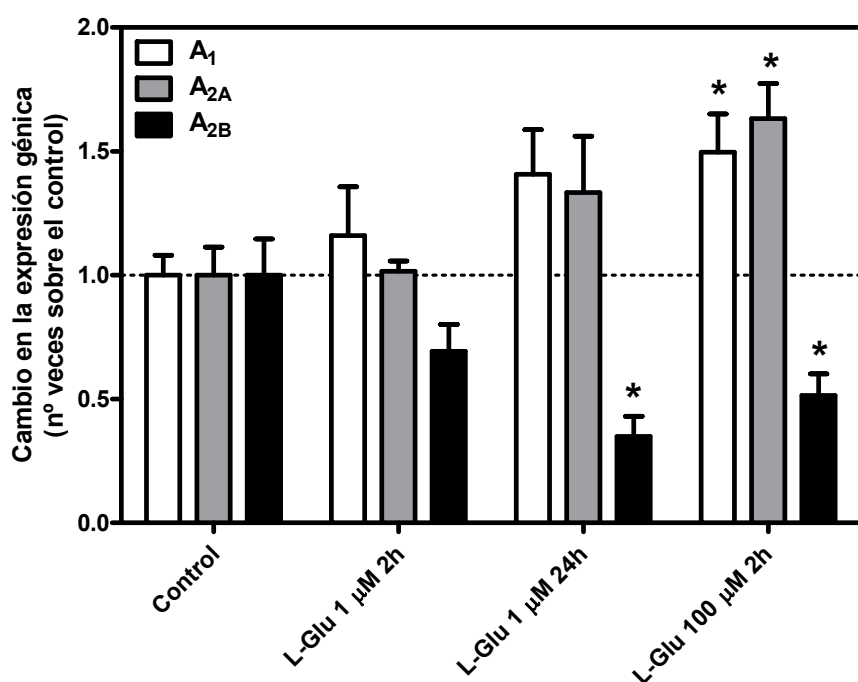


Figura 23: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión génica de A_1 , A_{2A} y A_{2B} . Neuronas corticales fueron expuestas a L-Glu 1 μ M durante 2 o 24 horas, L-Glu 100 μ M durante 2 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$, significativamente diferente con respecto al control.

En lo que se refiere al gen que codifica para el receptor A_{2A} , como se observa en la Figura 23, también se produce un aumento de la expresión del mismo como consecuencia de la exposición a L-Glu. Sin embargo, este aumento sólo se aprecia cuando las neuronas corticales se exponen a L-Glu 1 μ M 24 horas y a L-Glu 100 μ M durante 2 horas, siendo éste último el único caso en el que dicho aumento es significativo ($p < 0,05$).

Por último, en el caso del gen que codifica para el receptor A_{2B} , la regulación de la expresión génica ocurre en sentido contrario, tal y como se aprecia en la Figura 23, es decir, la exposición a L-Glu produce una

disminución en la expresión de dicho gen, apreciable desde la exposición a L-Glu 1 μ M durante 2 horas y siendo significativa para L-Glu 1 μ M 24 horas y L-Glu 100 μ M 2 horas ($p < 0,05$ en ambos casos).

Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que la exposición de neuronas corticales a L-Glu modula la expresión génica de los receptores de adenosina, siendo incrementada la expresión correspondiente a los genes que codifican para los receptores A_1 y A_{2A} y disminuida la expresión correspondiente al gen que codifica para el receptor A_{2B} , aunque estas variaciones sólo son estadísticamente significativas en el caso de la exposición a L-Glu 100 μ M durante 2h.

Para completar el estudio relativo a los receptores de adenosina, se comprobó cómo se veía afectada la vía de transducción de señales mediada por tales receptores tras la exposición de las neuronas corticales a L-Glu. Para ello, se recurrió a la determinación de la cantidad de AMPc que contenían las neuronas corticales después de haber sido estimulados los receptores de adenosina englobados en nuestro sistema de estudio. Así, dado que el receptor A_1 está acoplado de manera inhibitoria a la enzima AC se empleó forskolina, un diterpeno capaz de estimular directamente la AC, y CHA, un agonista específico del receptor A_1 , mientras que para el receptor A_{2A} , acoplado de manera estimuladora a la AC, se empleó el agonista CGS 21680. En este caso se emplearon las condiciones en las que se habían detectado mayores variaciones en la expresión de receptores A_1 y A_{2A} , tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína, esto es, la exposición a L-Glu 100 μ M durante 2h.

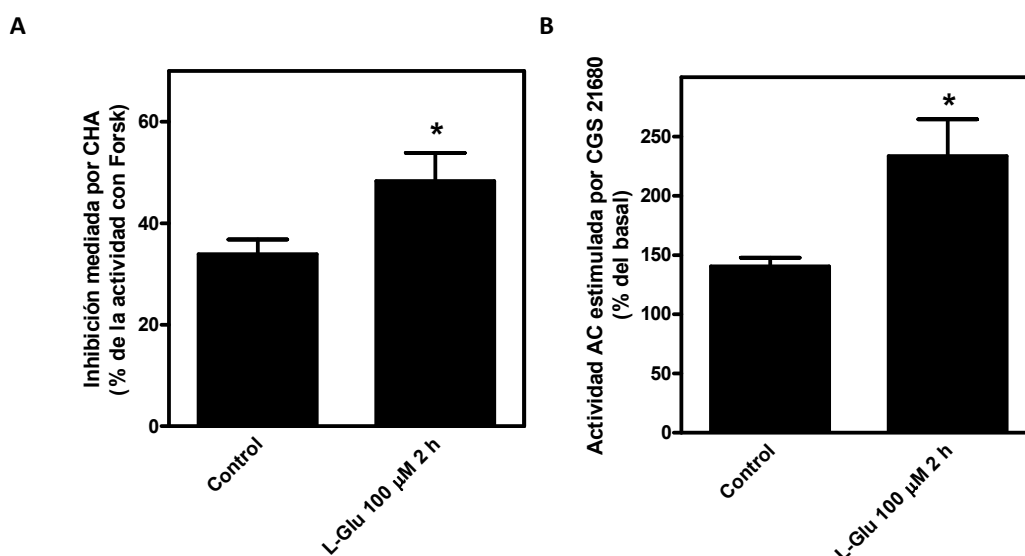


Figura 24: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la actividad AC. Neuronas corticales fueron expuestas o no a L-Glu 100 μ M durante 2 antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de AMPc. Se estudió el efecto de la exposición a L-Glutamato sobre la inhibición de la actividad AC por el receptor A_1 (panel A), empleando el agonista específico CHA a 100 μ M para inhibir la actividad estimulada por forskolina 5 μ M (Forsk). También se comprobó el efecto de la excitotoxicidad en la estimulación de la actividad AC promovida por el receptor A_{2A} (panel B), para lo cual se empleó el agonista específico CGS 21680 a 1 μ M. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. * $p < 0,05$ significativamente diferente de su correspondiente control. Actividad basal AC: Control: $0,94 \pm 0,27$; Tratada: $1,00 \pm 0,53$ pmol/mg·min.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24. La exposición a L-Glu no producía ningún efecto sobre la actividad basal de la enzima (Control: $1,21 \pm 0,35$; L-Glu 100 μ M 2h: $1,24 \pm 0,67$ pmol/mg·min). Sin

embargo, como se puede observar en el panel A, el efecto inhibitor de CHA sobre la enzima AC a través del receptor A_1 , era mayor, es decir se observaba una mayor inhibición de la enzima AC, previamente estimulada con forskolina, en las células expuestas a L-Glu, siendo además este aumento de un 42% en la capacidad de inhibición estadísticamente significativo (Control: $33,89 \pm 2,93\%$; L-Glu 100 μM 2h: $48,31 \pm 5,54\%$, $p < 0,05$).

Por otro lado, la estimulación de la AC vía receptor A_{2A} también producía cambios significativos, tal y como se expone en el panel B de la misma Figura. Como se observa, la estimulación del receptor A_{2A} con el agonista específico CGS 21680 era un 66% más elevada, es decir se detectaba una mayor producción de AMPc, en las neuronas corticales expuestas a L-Glu 100 μM durante 2h que en las células controles (Control: $140,43 \pm 7,18\%$; L-Glu 100 μM 2h: $233,47 \pm 31,29\%$, $p < 0,05$).

Estos resultados sugieren que la vía principal de transducción de señales mediada por los receptores A_1 y A_{2A} de adenosina en neuronas corticales de cerebro de rata se ven potenciadas como consecuencia de la exposición a L-Glu, observándose cambios tanto a nivel del número de receptores, como cambios en la expresión génica de los mismos que justifican la potenciación de su actividad, entendida ésta como la capacidad de alterar la concentración de segundos mensajeros intracelulares.

Una vez confirmada la modulación de la vía de transducción de la AC mediada por los receptores de adenosina como consecuencia de la exposición a L-Glu en neuronas corticales, se procedió a estudiar si esta exposición afectaba a la expresión del factor de transcripción CREB y a su modulador CREM, ya que CREB activa la transcripción de genes implicados en la supervivencia celular. Para ello se realizaron ensayos de RT-PCR a tiempo real empleando sondas específicas para ambos genes. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 25. Como se observa, la exposición a L-Glu produce una disminución de la expresión de ambos genes, siendo además esta disminución significativa en todos los casos. De este modo, para el gen que codifica para CREB se detectó una disminución con respecto al control de un 20% tras la exposición a L-Glu 1 μM durante 2 horas ($p < 0,05$), de un 29% si la exposición se prolongaba durante 24 horas ($p < 0,01$) y de un 37% si lo que se empleaba era L-Glu 100 μM durante 2 horas ($p < 0,001$). En el caso del gen codificante para la proteína CREM su disminución con respecto al control fue de un 29% para L-Glu 1 μM durante 2 horas ($p < 0,05$), de un 46% para la exposición durante 24 horas ($p < 0,001$) y de un 34% en caso de emplearse L-Glu 100 μM durante 2 horas ($p < 0,01$).

Estos resultados apuntan a que la expresión génica de los factores de transcripción CREB y CREM está disminuida en neuronas corticales como consecuencia de la exposición a L-Glu, lo que podría influenciar la supervivencia celular.

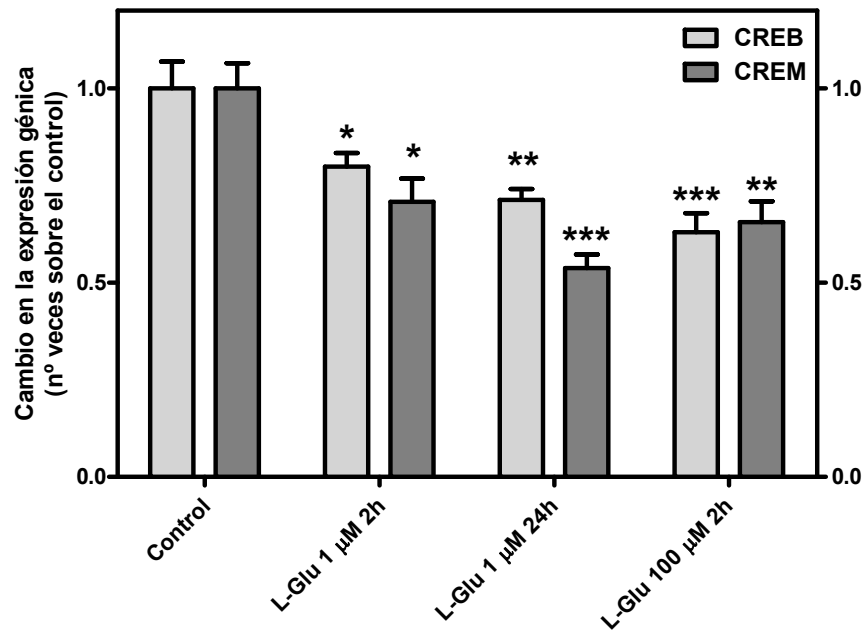


Figura 25: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión génica de los factores de transcripción CREB y CREM. Neuronas corticales fueron expuestas a L-Glu 1 μ M durante 2 o 24 horas, L-Glu 100 μ M durante 2 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes codificantes para los factores de transcripción CREB y CREM. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ significativamente diferente con respecto al control correspondiente.

d) Tabla resumen.

En la siguiente tabla se expone un resumen de los resultados obtenidos tras la exposición de cultivos primarios de neuronas corticales a glutamato. Todos ellos han sido comentados anteriormente, por lo que ahora sólo se expone el experimento realizado, si se ha encontrado variación o no y en qué sentido.

	L-Glu 1μM 2h	L-Glu 1μM 24h	L-Glu 100μM 2h	L-Glu 100μM 24h		L-Glu 1μM 2h	L-Glu 1μM 24h	L-Glu 100μM 2h	L-Glu 100μM 24h
Viabilidad	≈	↓	↓	↓	B _{max} unión [³ H]DPCPX			↑	
ARNm caspasa 3	≈	≈	≈		K _D unión L-[³ H]DPCPX			↑	
B _{max} unión L-[³ H]Glu	≈	↓	↓	↓	Proteína A ₁	≈	↑	≈	≈
K _D unión L-[³ H]Glu	↓	↓	↓	↓	B _{max} unión [³ H]ZM241385			↑	
Proteína mGlu ₁	↑	↑	↑	≈	K _D unión [³ H]ZM241385			↑	
ARNm mGlu ₁	≈	≈	↑		ARNm A ₁	≈	≈	↑	
Proteína mGlu ₅	≈	≈	↑	≈	ARNm A _{2A}	≈	≈	↑	
ARNm mGlu ₅	≈	≈	↑		ARNm A _{2B}	≈	↓	↓	
Proteína mGlu _{2,3}	≈	↑	↑	↑	Actividad A ₁ /AC			↑	
Proteína PLCβ ₁	↓	↑	↓	↓	Actividad A _{2A} /AC			↑	
ARNm PLCβ ₁	≈	≈	↓		ARNm CREB	↓	↓	↓	↓
Actividad PLC basal			≈		ARNm CREM	↓	↓	↓	↓
Actividad PLC grupo I			≈						
Actividad AC basal			≈						
Actividad AC grupo II			≈						
Actividad AC grupo III			↓						

Tabla 8: Resumen de los resultados obtenidos en neuronas corticales expuestas a L-Glu. En esta tabla se exponen gráficamente los resultados numéricos descritos en este capítulo. ≈, no hay variación estadística, ↑, se observa un aumento respecto a la situación control, ↓, se observa una disminución respecto a la situación control.

IV.2.2 En células C6 de glioma de rata.

Las células C6 constituyen un modelo ampliamente usado para el estudio de las propiedades gliales *in vitro*. En este apartado se completarán estudios realizados por este grupo de investigación en los que se demostró que la exposición a L-Glu en C6 producía la internalización del receptor por medio de vesículas cubiertas (Albasanz y col, 2002). Esta ampliación consistió en prolongar el tiempo de exposición a esta

sustancia con el fin de determinar la modulación sufrida por los receptores de glutamato y, de forma específica, algunos de sus subtipos.

Por otro lado, el estudio de la exposición a L-Glu se amplió a la modulación de los receptores de adenosina, recientemente caracterizados en esta línea celular (Castillo y col, 2007). Estudios previos de este grupo de investigación demostraban la existencia de trans-modulación entre estos receptores y los de glutamato en cerebro de rata (León y col, 2008), lo que avalaba la ampliación de estos estudios a los receptores de adenosina en células C6.

a) Viabilidad.

El efecto de la exposición a L-Glu 100 μ M a distintos tiempos sobre la viabilidad celular se midió empleando el reactivo MTT. Los resultados obtenidos exponiendo las células C6 a L-Glu durante 6, 24 y 48 horas se muestran en la Figura 26. Como se observa, la exposición prolongada de estas células a condiciones que en neuronas corticales resultaron tóxicas, no produce alteraciones significativas en los valores obtenidos de la viabilidad celular a cada tiempo ensayado (L-Glu 100 μ M: 6h: $95,60 \pm 3,55$; 24h: $102,20 \pm 6,07$; 48h: $95,69 \pm 3,13\%$).

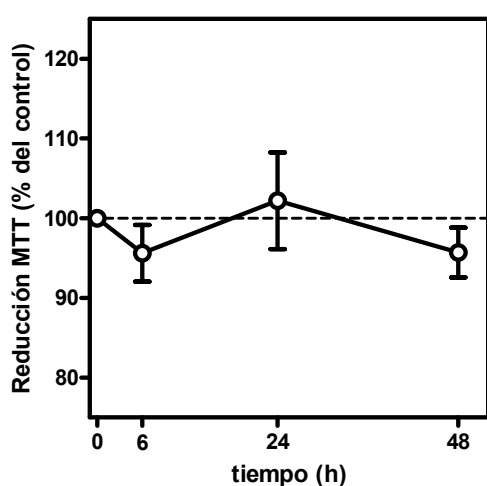
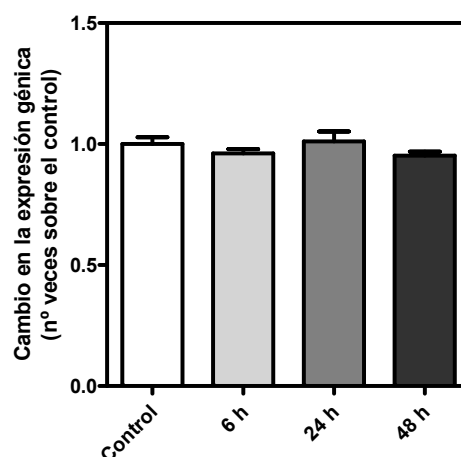


Figura 26: Las células C6 son resistentes a la exposición a L-Glu 100 μ M. Las células C6 fueron expuestas a L-Glu 100 μ M durante 6, 24 o 48 horas, trascurridas las cuales se midió la viabilidad celular por el método del MTT. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por triplicado, expresados porcentualmente con respecto a la viabilidad de las células controles.

Estos resultados demuestran que las células C6 son resistentes a exposiciones a glutamato que, en otros modelos celulares, resultan enormemente tóxicas.

No obstante, se comprobó por PCR a tiempo real si existían variaciones en la expresión génica de la caspasa 3. Como se expone en la Figura 27, no se aprecian variaciones en la expresión de la caspasa 3, como era de esperar tras comprobar la viabilidad.

Figura 27: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión de caspasa 3. Las células C6 fueron expuestas a L-Glu 100 μ M durante 6, 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando una sonda específica para el gen codificante para la caspasa 3. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras.



b) Receptores metabotrópicos de Glutamato.

La cuantificación de los receptores metabotrópicos de glutamato se realizó mediante ensayos de unión de radioligando, como se describe en *Métodos*. Los resultados obtenidos en células C6 expuestas a L-Glu 100 μ M durante 6, 24 y 48 horas se exponen en la Figura 28.

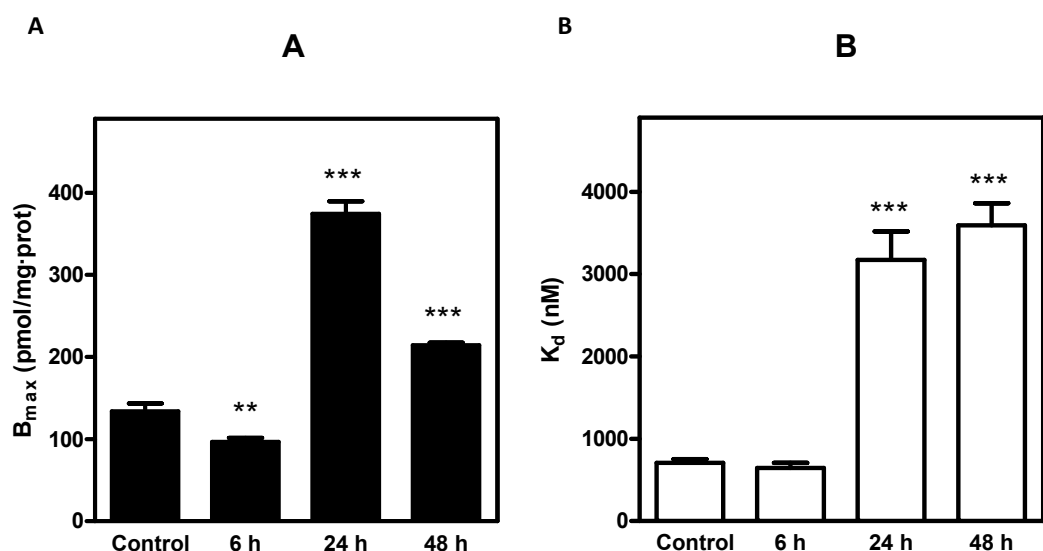


Figura 28: La exposición a L-Glu modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular de las células C6. Las células C6 se expusieron a L-Glu 100 μ M durante 6, 24 o 48 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando L-[³H]Glu. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes pases. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_d (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el software GraphPad Prism 5.0. ** p<0,01, *** p<0,001 significativamente diferente con respecto al control.

Como se aprecia, la modulación observada en las células C6 en función del tiempo de exposición a L-Glu es distinta. En el caso del número total de receptores (panel A) a tiempos cortos de exposición a L-Glu se observa un descenso significativo de un 28% (p<0,05). Sin embargo, si el tiempo de exposición se prolonga, se aprecia que el número de receptores aumenta considerablemente, de hecho tras 24 horas de exposición el número de receptores totales aumenta un 180% (p<0,001). Si la exposición se prolonga hasta las 48 horas el

número de receptores sigue siendo mayor que en la condición control en un 60% ($p < 0,001$) pero menor que el dato obtenido a las 24 horas.

Si nos fijamos en la afinidad de estos receptores por su ligando (panel B) de nuevo se aprecia ese efecto bifásico. Mientras que tras 6 horas de exposición la afinidad de los receptores por su ligando no variaba, tras 24 y 48 horas de exposición la afinidad de estos receptores disminuía alrededor a 4,5 veces sobre la afinidad detectada en condiciones controles ($p < 0,001$ en ambos casos).

La comparación estadística de los datos obtenidos entre los distintos tiempos de exposición revela que, en el caso de las B_{\max} , todos los grupos de datos son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0,001$ en todos), mientras que en el caso de las K_D , sólo las variaciones observadas entre la afinidad de estos receptores tras 6 y 24 y tras 24 y 48 horas son estadísticamente diferentes ($p < 0,001$ en todos).

Estos resultados sugieren que la exposición a L-Glu modula notablemente la expresión proteica de los receptores metabotrópicos de glutamato así como la afinidad de los mismos de forma dependiente del tiempo de exposición. A continuación se expone un resumen (Tabla 9) con los parámetros cinéticos obtenidos en estos experimentos.

	Control	L-Glu 100 μ M 6h	L-Glu 100 μ M 24h	L-Glu 100 μ M 48h
B_{\max} (pmol/mg)	133,75 \pm 9,54	96,82 \pm 4,66 **	374,50 \pm 15,26 ***	214,54 \pm 2,76 ***
K_D (nM)	707,59 \pm 44,45	643,96 \pm 61,59	3171,99 \pm 345,03 ***	3592,50 \pm 268,08 ***

Tabla 9: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en células C6 expuestas a L-Glu. En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente respecto al correspondiente control.

El estudio de la regulación de los receptores metabotrópicos de glutamato como consecuencia de la exposición de la línea C6 a L-Glu se amplió realizando ensayos de inmunocitoquímica, en los que, mediante el empleo de anticuerpos específicos se estudió la modulación de los subtipos mGlu₁, mGlu₅ y mGlu_{2,3}, a nivel de la membrana plasmática, así como la de la proteína PLC β_1 . Micrografías representativas de las imágenes obtenidas se exponen en la Figura 29. Por otro lado, en la Figura 30 se muestran los valores obtenidos para la cuantificación de la fluorescencia de las series de imágenes, así como del análisis estadístico realizado.

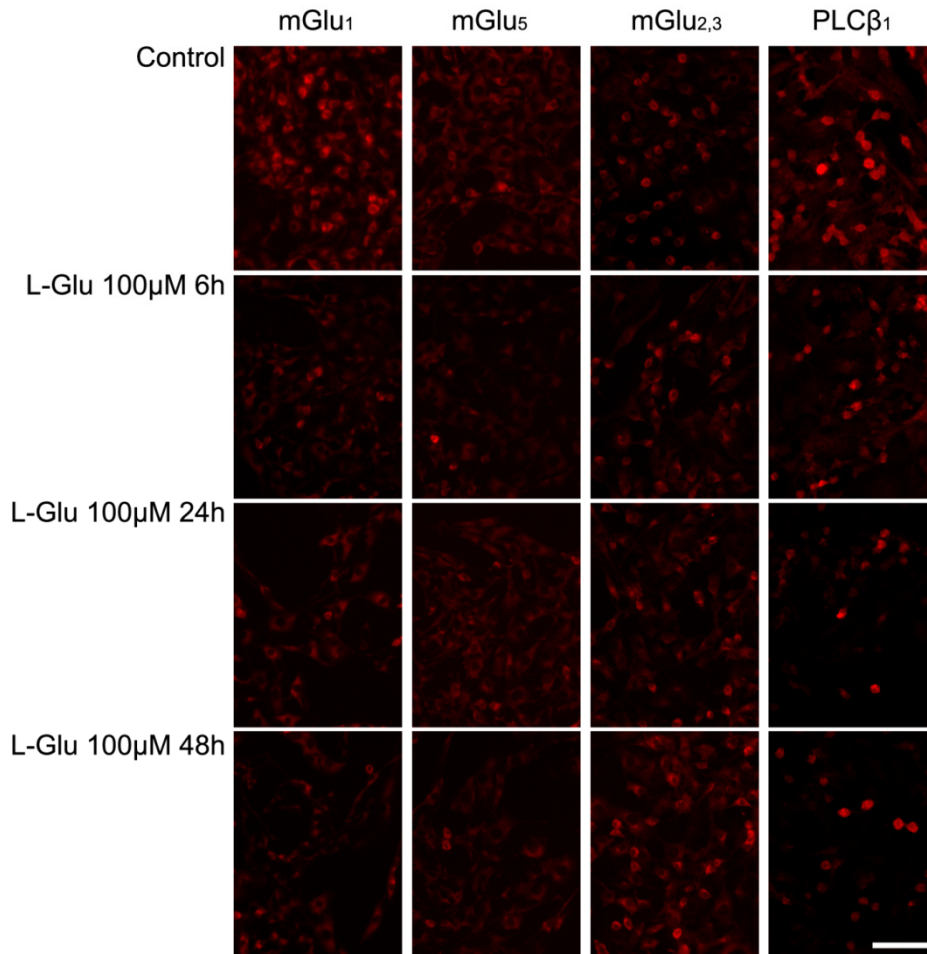


Figura 29: Inmunodetección de mGlu y PLC β ₁. Micrografías representativas de los resultados obtenidos tras los experimentos de inmunofluorescencia al emplear los anticuerpos para mGlu₁, mGlu₅, mGlu_{2,3} y PLC β ₁ en las distintas condiciones experimentales. La barra representa 62 μ m.

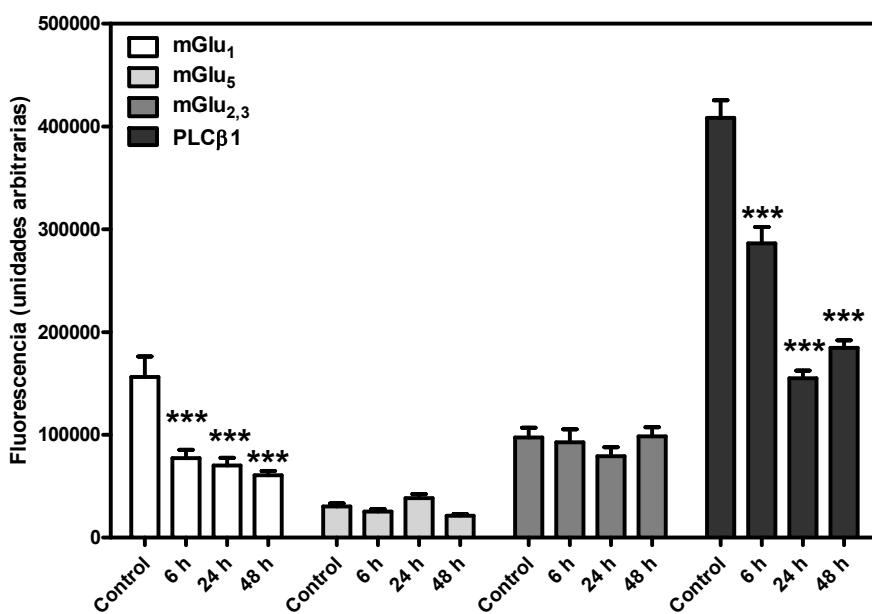


Figura 30: La exposición a L-Glu modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular. Diagrama de barras que resume los resultados expuestos en la Figura 29. Las cuantificaciones se realizaron usando el *software* LAS AF empleando un mínimo de 30 campos por condición. Se exponen las medias \pm SEM obtenidas para cada condición experimental. *** $p < 0,001$ estadísticamente diferente con respecto al correspondiente control.

A continuación se expone una tabla resumen con las variaciones observadas en estos experimentos.

	mGlu ₁	mGlu ₅	mGlu _{2,3}	PLCβ ₁
L-Glu 100 μM 6h	↓***	≈	≈	↓***
L-Glu 100 μM 24h	↓***	≈	≈	↓***
L-Glu 100 μM 48h	↓***	≈	≈	↓***

Tabla 10: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de inmunofluorescencia en células C6 expuestas a L-Glu. Se muestra el sentido de la variación observada con respecto al control mediante flechas: ↑ aumenta; ↓ disminuye. *** p<0,001 significativamente diferente con respecto a su correspondiente control.

Como se observa, la modulación de los receptores de glutamato como consecuencia de la exposición a su agonista endógeno es específica de cada subtipo. Así, mientras que el subtipo mGlu₁ disminuye significativamente sus niveles en la membrana plasmática en todas las condiciones empleadas, los subtipos mGlu₅ y mGlu_{2,3} no resultan modulados en estas condiciones. Por otro lado la cantidad de la PLCβ₁ también disminuye de forma significativa en todas las condiciones ensayadas.

Estos resultados sugieren que la exposición a L-Glu modula a la baja selectivamente, al menos, el subtipo mGlu₁ de los receptores metabotrópicos de glutamato, modulación que va acompañada de una análoga en la cantidad de PLCβ₁.

Con el fin de determinar si los cambios observados eran producidos por una modulación de la expresión génica inducida por la exposición a L-Glu en las células C6, se cuantificó la cantidad de ARNm correspondiente a las proteínas mGlu₁ y PLCβ₁ por PCR a tiempo real en las distintas condiciones experimentales ensayadas.

Como se expone en la Figura 31, la exposición a L-Glu no produce cambios significativos en la expresión génica de mGlu₁, en ninguna de las situaciones estudiadas. Sin embargo, para la expresión génica de PLCβ₁ se aprecia una disminución significativa de los niveles de ARNm en comparación con la situación control tras 24 (p<0,05) y 48 horas de exposición (p<0,01). Estas disminuciones se corresponden con un 8%, un 10% y un 18% menos en la expresión génica promedio de PLC β₁ tras 6, 24 y 48 horas, respectivamente, de exposición a L-Glu.

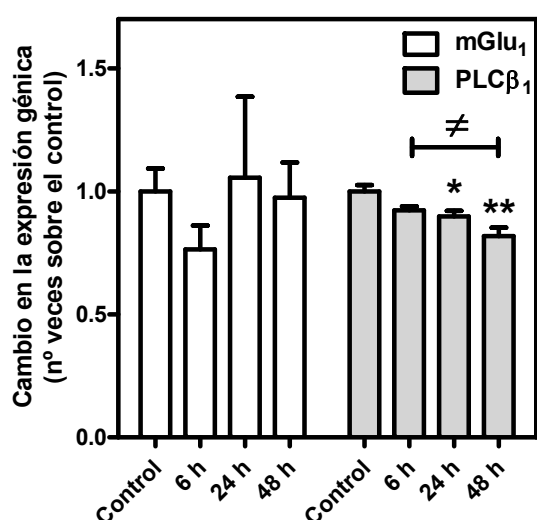


Figura 31: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión génica de mGlu₁ y PLCβ₁. Células C6 fueron expuestas a L-Glu 100 μ M durante 6, 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, significativamente diferente con respecto al control.

Debido a las variaciones en la cantidad de proteína detectadas por inmunofluorescencia se realizó un estudio más exhaustivo de la funcionalidad del sistema formado por los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I y la actividad enzimática principal a la que están acoplados. Para ello se realizaron ensayos enzimáticos de la actividad PLC. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 32.

En el panel A de la mencionada figura se observan las variaciones detectadas en la actividad basal de la enzima PLC. Como se aprecia, a pesar de la disminución detectada en la isoforma β_1 , por inmunofluorescencia y PCR, no se observan variaciones significativas en la actividad basal de esta enzima tras la exposición de la línea celular C6 a L-Glu (Control: $7,39 \pm 0,35$; L-Glu 100 μ M: 6h: $6,47 \pm 0,36$; 24h: $6,57 \pm 0,24$; 48h: $9,53 \pm 1,41$ pmol/mg·min).

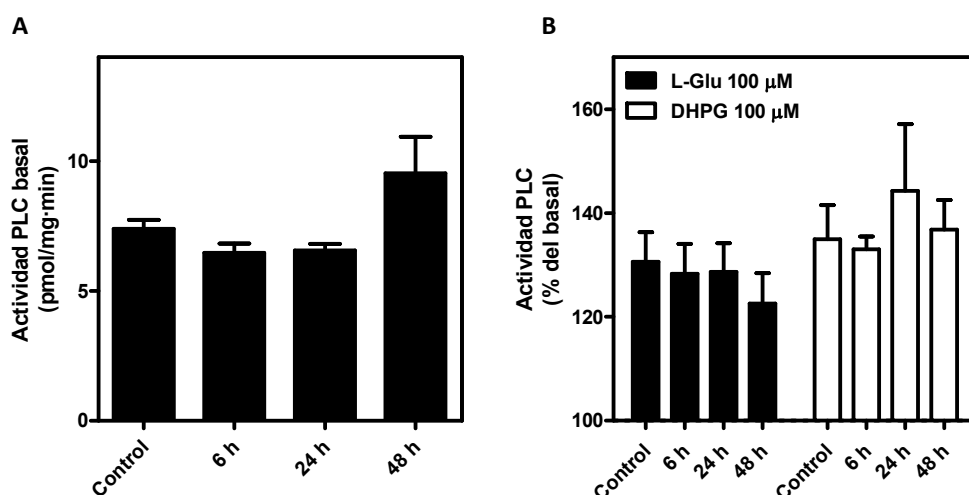


Figura 32: La exposición a L-Glu no varía la actividad PLC. Células C6 fueron expuestas o no a L-Glu 100 μ M durante 6, 24 y 48 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de IP₃. Se estudió el efecto de la exposición a L-Glutamato sobre la actividad PLC basal (panel A), así como su efecto sobre la funcionalidad del sistema estimulado por L-Glu o DHPG 100 μ M de los receptores metabotrópicos de glutamato (panel B). Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos pases. Todas las estimulaciones con L-Glu o DHPG resultaron estadísticamente significativas con respecto al basal (al menos, $p < 0,05$).

En el panel B se expone la capacidad del propio L-Glu y del (S)-DHPG de estimular la hidrólisis de fosfatidilinositoles. Como se observa, no se aprecian diferencias significativas en la capacidad de cada uno de ellos de estimular la actividad PLC a través de los receptores metabotrópicos del grupo I como consecuencia de la exposición de las células C6 a L-Glu 100 μ M (L-Glu % basal: Control: $130,59 \pm 5,72$; L-Glu 100 μ M: 6h: $28,32 \pm 5,74$; 24h: $128,67 \pm 5,54$; 48h: $122,56 \pm 5,88\%$; (S)-DHPG % basal: Control: $134,95 \pm 6,57$; L-Glu 100 μ M: 6h: $133,01 \pm 2,44$; 24h: $144,27 \pm 12,84$; 48h: $136,84 \pm 5,64\%$). Cabe destacar que todos los datos obtenidos son estadísticamente diferentes del correspondiente valor basal (al menos $p < 0,05$).

Estos resultados apuntan a que, a pesar de las variaciones observadas en el receptor mGlu₁ en membrana plasmática y en la cantidad total de la isoforma PLC β_1 , la capacidad de estimulación de la actividad PLC empleando ligandos del grupo I no resulta alterada en estas condiciones, es decir, la disminución en mGlu₁ y PLC β_1 no es suficiente para disminuir la funcionalidad del sistema, lo que implica que la presencia del receptor mGlu₅ debe ser determinante para ésta.

Por último, se examinó la influencia de la exposición a L-Glu sobre la actividad adenilato ciclasa dependiente de los receptores metabotrópicos de los grupos II y III. Como se expone en la Figura 33, panel A, la actividad basal de esta enzima no resulta modulada como consecuencia de la exposición a L-Glu (Control: $1,18 \pm 0,05$; L-Glu 100 μ M: 6h: $1,16 \pm 0,23$; 24h: $0,76 \pm 0,25$; 48h: $1,01 \pm 0,08$ pmol/mg·min).

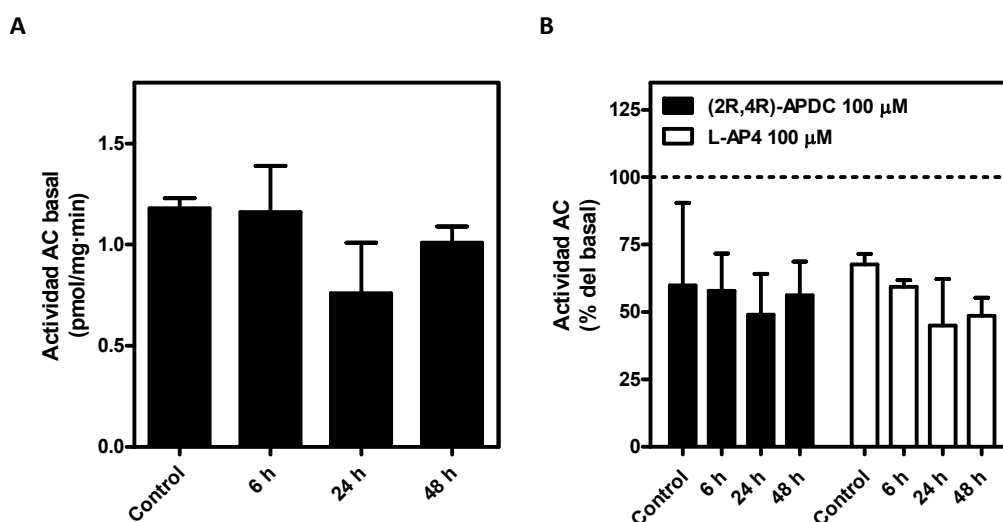


Figura 33: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la actividad AC. Células C6 fueron expuestas o no a L-Glu 100 μ M durante 6, 24 y 48 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de AMPc. Se estudió el efecto de la exposición a L-Glutamato sobre la actividad AC basal (panel A), así como su efecto sobre la funcionalidad del sistema inhibido por un agonista del grupo II de los receptores metabotrópicos de glutamato, (2R,4R)-APDC, y por un agonista del grupo III, L-AP4 (panel B). Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos pases.

En el panel B, se aprecia la capacidad de inhibir la actividad AC basal de (2R,4R)-APDC, agonista de los receptores del grupo II, y L-AP4, agonista de los receptores del grupo III. En el caso de los receptores metabotrópicos del grupo II se observa que el promedio de inhibición de la AC es similar en todas las

situaciones estudiadas (% basal: Control: $59,83 \pm 30,63$; L-Glu $100 \mu\text{M}$: 6h: $57,86 \pm 13,78$; 24h: $49,06 \pm 15,11$; 48h: $56,21 \pm 12,49\%$). Sin embargo, en los datos obtenidos empleando L-AP4, se observa una cierta tendencia, no significativa, en la que aparentemente se aprecia una inhibición mayor de esta enzima según se prolonga el tratamiento en el tiempo (% basal: Control: $67,63 \pm 3,91$; L-Glu $100 \mu\text{M}$: 6h: $59,30 \pm 2,57$; 24h: $44,94 \pm 17,22$; 48h: $48,59 \pm 6,65\%$).

En resumen, la actividad AC basal no resulta modulada de forma significativa por la exposición a L-Glu, sin embargo se aprecia una cierta tendencia de los receptores del grupo III de células expuestas a L-Glu a inhibir en mayor medida esta actividad enzimática.

c) Receptores de adenosina.

Al igual que en neuronas corticales, los procesos de trans-modulación que ejercía la exposición a L-Glu en cultivo sobre los receptores de adenosina se estudiaron con detalle en las células C6 de glioma de rata.

Para estudiar el efecto de dicha exposición sobre los receptores A_1 de adenosina a nivel de la membrana plasmática en esta línea celular se empleó la técnica de unión de radioligando, usando $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$ como antagonista específico del receptor A_1 y CPA frío para calcular la unión inespecífica. Los resultados se muestran en la Figura 34.

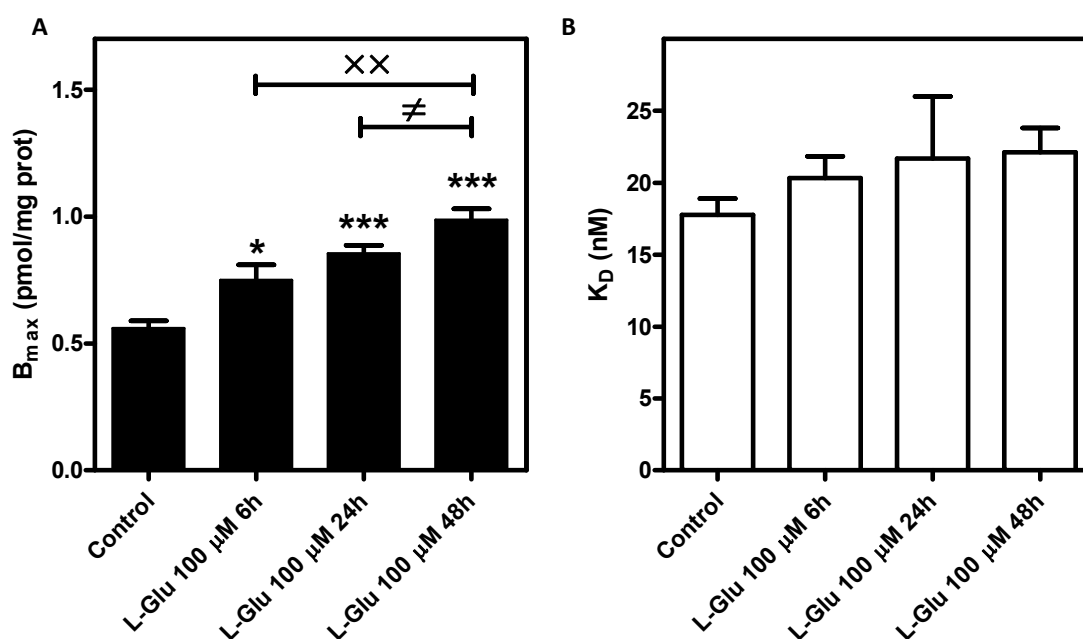


Figura 34: La exposición a L-Glu modula los receptores A_1 en la superficie celular de las células C6. Las células C6 se expusieron a L-Glu $100 \mu\text{M}$ durante 6, 24 o 48 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando $[^3\text{H}]\text{DPCPX}$. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes pases. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. * p < 0,05, *** p < 0,001 significativamente diferente con respecto al control; xx p < 0,01 significativamente diferente con respecto a las 6 horas de exposición; ≠ p < 0,05 significativamente diferente con respecto a las 24 horas de exposición.

Como se observa en la mencionada figura, panel A, la exposición a L-Glu 100 μ M a distintos tiempos también ejerce un efecto sobre el número de receptores A_1 existentes en la superficie de estas células. En concreto, dicha exposición aumenta significativamente el número de receptores A_1 en la membrana plasmática de las células C6 de glioma de rata, observándose a las 6 horas de exposición un aumento del 34%, a las 24 horas un aumento del 53% y a las 48 horas de exposición un aumento del 76% con respecto al control (Control: $0,558 \pm 0,030$; L-Glu 100 μ M 6h: $0,750 \pm 0,059$, $p < 0,05$; L-Glu 100 μ M 24h: $0,854 \pm 0,032$, $p < 0,001$; L-Glu 100 μ M 48h: $0,986 \pm 0,045$ pmol/mg, $p < 0,001$). Los resultados obtenidos demuestran que, además, este aumento del número de receptores es progresivo, es decir, cuanto más prolongado es el tiempo de tratamiento mayor es el efecto que ejerce el L-Glu sobre los receptores A_1 , siendo significativas las diferencias entre el efecto de la exposición a L-Glu 100 μ M durante 6 horas y 48 horas ($p < 0,01$) y durante 24 horas y 48 horas ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos para el análisis de la afinidad se exponen en el panel B de la misma Figura. Como se puede observar la exposición a L-Glu no producía variaciones significativas en la afinidad obtenida en estos experimentos con respecto a la control (Control: $17,75 \pm 1,15$; L-Glu 100 μ M 6h: $20,32 \pm 1,53$; L-Glu 100 μ M 24h: $21,68 \pm 4,31$; L-Glu 100 μ M 48h: $22,11 \pm 1,69$ nM).

Posteriormente se estudió si la exposición prolongada a L-Glu también modulaba la expresión de los receptores A_{2A} de adenosina, para ello se empleó el ensayo de unión de radioligandos, usando el antagonista específico de A_{2A} [3 H]ZM241385 como ligando tritado. Los resultados se muestran en la Figura 35.

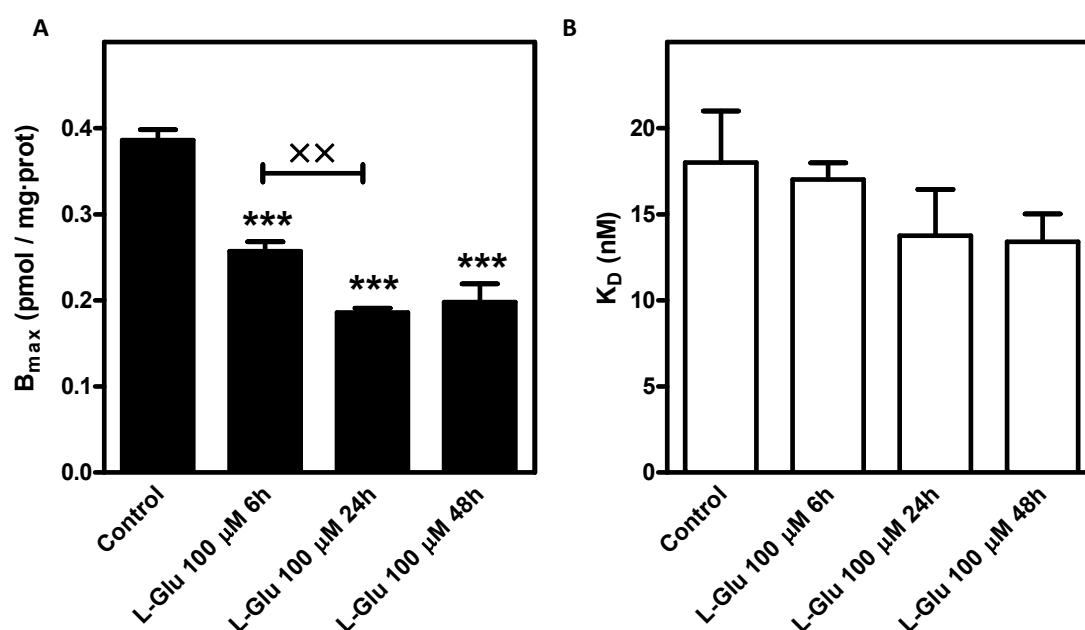


Figura 35: La exposición a L-Glu modula los receptores A_{2A} en la superficie celular de las células C6. Las células C6 se expusieron a L-Glu 100 μ M durante 6, 24 o 48 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [3 H]ZM241385. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes pases. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control; xx $p < 0,01$ significativamente diferente con respecto a las 6 horas de exposición.

Como se observa en la Figura 35, panel A, la exposición a L-Glu ejercía sobre el número total de receptores A_{2A} el efecto contrario que el descrito para el receptor A_1 , es decir, en este caso el L-Glu disminuía la densidad de los receptores A_{2A} en la superficie celular, siendo esta disminución de un 33% a las 6 horas de exposición, un 52% a las 24 horas y un 49% a las 48 horas con respecto al número de receptores en la situación control (Control: $0,386 \pm 0,012$; L-Glu 100 μ M 6h: $0,257 \pm 0,011$, $p < 0,001$; L-Glu 100 μ M 24h: $0,186 \pm 0,005$, $p < 0,001$; L-Glu 100 μ M 48h: $0,198 \pm 0,021$ pmol/mg, $p < 0,001$). De manera similar a lo que ocurría en el caso del receptor A_1 , para el receptor A_{2A} el efecto de la exposición a L-Glu también es gradual hasta las 24 horas de exposición, siendo significativas las diferencias entre los datos obtenidos a las 6 horas de exposición y a las 24 horas ($p < 0,01$) aunque estando la diferencia entre los datos obtenidos a las 6 y a las 48 horas cercana a la significatividad ($p = 0,068$). Por otro lado no se observan diferencias significativas entre los resultados obtenidos a 24 y a 48 horas de exposición a L-Glu.

En el panel B se pueden comprobar los resultados obtenidos para el análisis de la afinidad en estos mismos experimentos. Como se observa, la exposición a L-Glu no ejercía cambios significativos en la afinidad de estos receptores A_{2A} por su ligando, sin embargo se observa una cierta tendencia hacia valores más bajos de K_D según se prolonga la exposición a este agente (Control: $18,01 \pm 2,99$; L-Glu 100 μ M 6h: $17,02 \pm 0,97$; L-Glu 100 μ M 24h: $13,75 \pm 2,69$; L-Glu 100 μ M 48h: $13,41 \pm 1,61$ nM).

Todos estos resultados, tomados en conjunto, apuntan a que la exposición a L-Glu 100 μ M en células C6 de glioma de rata, ya sea a tiempos cortos o largos, produce efectos antagónicos sobre los receptores A_1 y A_{2A} de adenosina. Sobre los primeros, el L-Glu induce un aumento gradual de los mismos sin variar la afinidad de estos por su ligando, mientras que sobre los segundos induce una disminución muy marcada de los mismos sin afectar tampoco a su afinidad. Sin embargo esta exposición tiene su efecto máximo a las 24 horas y su efecto sobre los receptores A_{2A} , al contrario de lo que ocurría con los receptores A_1 , no aumenta si se prolonga el tiempo de exposición a L-Glu hasta las 48 horas.

Una vez analizado el efecto de la exposición a L-Glu en las células C6 a nivel de la membrana plasmática, se procedió a comprobar si existía algún efecto sobre la expresión de los genes que codifican para los receptores de adenosina. Para ello se realizaron ensayos de PCR a tiempo real empleando sondas específicas para los 4 receptores de adenosina descritos hasta la fecha y el gen de la β -actina como control interno.

Como se observa en la Figura 36, panel A, la exposición a L-Glu en estas células no produce variaciones significativas en la expresión de los genes que codifican para los receptores A_1 y A_{2B} . Sin embargo, tal y como se muestra en el panel B, para los genes correspondientes a los receptores A_{2A} y A_3 sí se observaban variaciones significativas a todos los tiempos de exposición a L-Glu. De este modo, para el gen que codifica para el receptor A_{2A} se observó una disminución drástica de la expresión del mismo pero, al contrario de lo que ocurría en el ensayo de unión de radioligando, esta disminución no estaba relacionada con el tiempo de exposición al aminoácido (Control: $1,00 \pm 0,11$; L-Glu 100 μ M 6h: $0,43 \pm 0,14$, $p < 0,05$; L-Glu 100 μ M 24h: $0,52 \pm 0,05$, $p < 0,05$; L-Glu 100 μ M 48h: $0,34 \pm 0,07$, $p < 0,01$). En el caso del gen que codifica para el receptor A_3 , el efecto producido por la exposición a L-Glu 100 μ M era similar al observado en el caso anterior pero la disminución en este caso

es menos drástica aunque igualmente significativa (Control: $1,00 \pm 0,03$; L-Glu 100 μM 6h: $0,78 \pm 0,03$, $p < 0,01$; L-Glu 100 μM 24h: $0,61 \pm 0,07$, $p < 0,05$; L-Glu 100 μM 48h: $0,64 \pm 0,06$, $p < 0,01$).

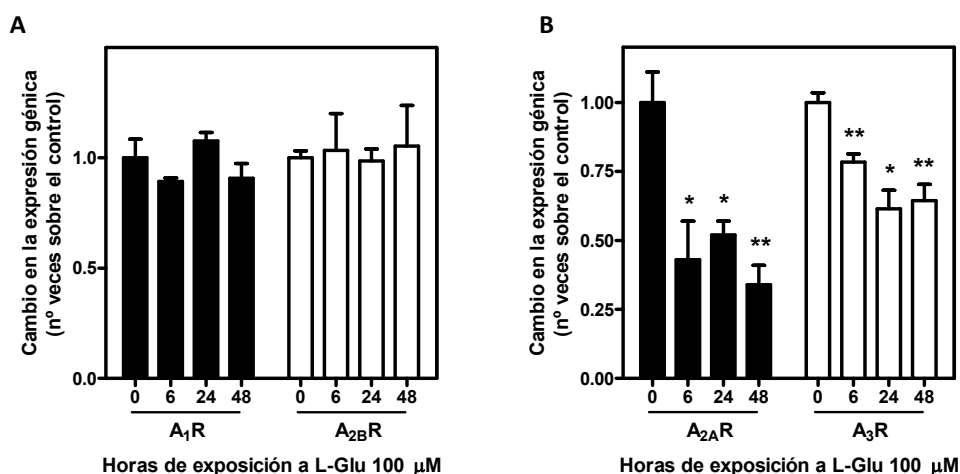


Figura 36: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión génica de los receptores de adenosina. Células C6 fueron expuestas a L-Glu 100 μM durante 6, 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. La exposición a L-Glu no afecta a la expresión de A₁ y A_{2B} (panel A), aunque disminuye la de A_{2A} y A₃ (panel B). Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, significativamente diferente con respecto a su control.

Estos resultados indican que mientras que el glutamato ejerce un efecto a nivel de la regulación de la expresión génica para el receptor A_{2A}, observándose disminuciones en la expresión de este gen al igual que se observaron en el ensayo de unión de radioligando, en el caso del receptor A₁ los aumentos a nivel de proteína descritos con anterioridad no se deben a variaciones de la expresión del correspondiente gen, sino a mecanismos post-transcripcionales.

Además, se comprobó el efecto que ejercía la exposición prolongada a L-Glu 100 μM sobre las vías principales de transducción de señales de los receptores estudiados, esto es, la inhibición de la actividad AC por parte del receptor A₁ y la activación de la misma actividad enzimática por parte del receptor A_{2A}. Para ello se midió la cantidad de AMPc formado cuando estas células, previamente expuestas o no a L-Glu 100 μM durante los distintos tiempos, se enfrentaban a los agonistas específicos de los receptores A₁ y A_{2A}.

Como se observa en la Figura 37, panel A, la capacidad del ligando CHA de inhibir la actividad AC previamente estimulada con forskolina aumentaba de forma significativa en las células C6 tras la exposición de las mismas a L-Glu durante 24 y 48 horas, correspondiéndose ésta con un 13% y un 31% de incremento en la capacidad inhibidora con respecto a la situación control. Sin embargo, la exposición a L-Glu 100 μM durante 6 horas no producía efecto alguno en la capacidad inhibidora del CHA sobre el sistema descrito (Control: $47,58 \pm 0,99$; L-Glu 100 μM 6h: $38,42 \pm 4,62$; L-Glu 100 μM 24h: $53,74 \pm 0,83$, $p < 0,05$; L-Glu 100 μM 48h: $62,24 \pm 2,12$, $p < 0,05$).

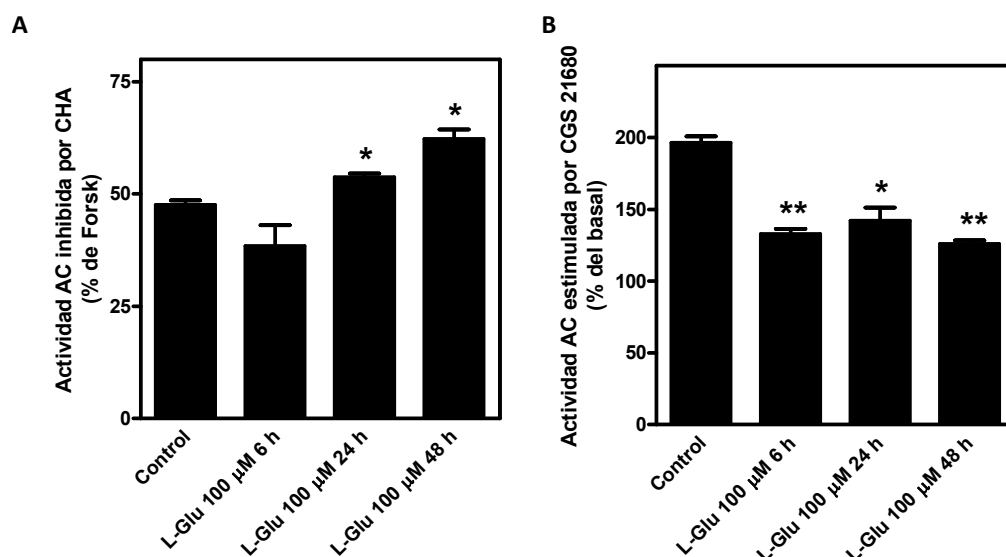


Figura 37: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la actividad AC. Células C6 fueron expuestas o no a L-Glu 100 μ M durante 6, 24 o 48 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de AMPc. Se estudió el efecto de la exposición a L-Glutamato sobre la inhibición de la actividad AC por el receptor A_1 (panel A), empleando el agonista específico CHA a 100 μ M para inhibir la actividad estimulada por forskolina 5 μ M. También se comprobó el efecto en la estimulación de la actividad AC promovida por el receptor A_{2A} (panel B), para lo cual se empleó el agonista específico CGS 21680 a 1 μ M. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente con su correspondiente control. Actividad AC Basal: Control: $7,39 \pm 0,35$; L Glu 100 μ M: 6h: $6,47 \pm 0,36$; 24h: $6,57 \pm 0,24$; 48h: $9,53 \pm 1,41$ pmol/mg·min.

Por último, como se observa en el panel B de la misma Figura, la exposición a L-Glu, ya sea a tiempos cortos o prolongados, disminuye la capacidad del CGS 21680 para estimular el sistema AC en un 32%, un 28% y un 36% en las exposiciones a L-Glu a 6, 24 y 48 horas de exposición, respectivamente (Control: $196,33 \pm 4,53$; L-Glu 100 μ M 6h: $132,92 \pm 3,47$, $p < 0,01$; L-Glu 100 μ M 24h: $142,11 \pm 9,05$, $p < 0,05$; L-Glu 100 μ M 48h: $125,96 \pm 2,30$, $p < 0,01$).

Estos resultados indican que el principal sistema de transducción al que están acoplados los receptores A_1 y A_{2A} en células C6 resulta afectado como consecuencia de la exposición de estas células a L-Glu 100 μ M, observándose una potenciación de la vía inhibitoria mediada por el receptor A_1 y una desensibilización de la vía estimuladora mediada por A_{2A} .

De forma adicional se estudió el efecto que ejercía la exposición a L-Glu sobre dos factores de transcripción constitutivos relacionados con el AMPc, los factores CREB y CREM. Así, se estudió por PCR a tiempo real si la expresión génica de estos factores resultaba modulada en estos experimentos. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 38

Como se observa, sólo tras 48 horas de exposición a L-Glu 100 μ M se modulaba la expresión de estos factores de transcripción de forma significativa. En ambos casos se detectó una disminución de la cantidad de ARNm con respecto a la situación control. En el caso de CREB se cuantificó una disminución de la expresión

génica de un 10% ($p<0,05$), en el caso de CREM esta disminución fue más acusada y llegaba hasta el 20% con respecto a su expresión basal ($p<0,05$).

Dado que la expresión de ambos factores es constitutiva y su eliminación produce un fenotipo embrionario letal, podríamos postular que, a pesar de que las células C6 son resistentes al daño excitotóxico inducido por glutamato, si se prolongara lo suficiente el tiempo de exposición a esta misma concentración de glutamato podríamos llegar a desencadenar procesos de muerte neuronal.

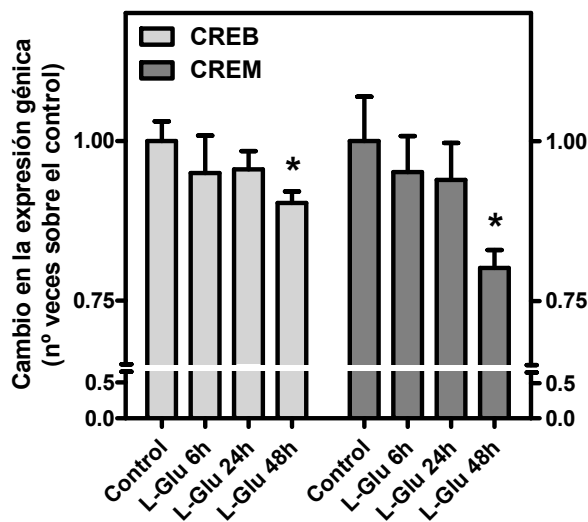


Figura 38: Efecto de la exposición a L-Glu sobre la expresión génica de los factores CREB y CREM. Células C6 fueron expuestas a L-Glu 100 μ M durante 6, 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes codificantes para los factores de transcripción CREB y CREM. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p<0,05$ significativamente diferente con respecto al control.

d) Tabla resumen.

Un resumen de los datos obtenidos en los experimentos descritos en este capítulo se expone en la siguiente tabla (Tabla 11). En la misma, sólo se muestra si se han observado variaciones en los parámetros medidos con respecto a la situación control y en qué sentido se producen las mismas, ya que los datos numéricos han sido aportados con anterioridad.

	L-Glu 100μM 6h	L-Glu 100μM 24h	L-Glu 100μM 48h		L-Glu 100μM 6h	L-Glu 100μM 24h	L-Glu 100μM 48h
Viabilidad	≈	≈	≈	B _{max} unión [³ H]DPCPX	↑	↑	↑
ARNm caspasa 3	≈	≈	≈	K _D unión [³ H]DPCPX	≈	≈	≈
B _{max} unión L-[³ H]Glu	↓	↑	↑	B _{max} unión [³ H]ZM241385	↓	↓	↓
K _D unión L-[³ H]Glu	≈	↑	↑	K _D unión [³ H]ZM241385	≈	≈	≈
Proteína mGlu ₁	↓	↓	↓	ARNm A ₁	≈	≈	≈
ARNm mGlu ₁	≈	≈	≈	ARNm A _{2A}	↓	↓	↓
Proteína mGlu ₅	≈	≈	≈	ARNm A _{2B}	≈	≈	≈
Proteína mGlu _{2,3}	≈	≈	≈	ARNm A ₃	↓	↓	↓
Proteína PLCβ ₁	↓	↓	↓	Actividad A ₁ /AC	↑	↑	↑
ARNm PLCβ ₁	≈	↓	↓	Actividad A _{2A} /AC	↓	↓	↓
Actividad PLC basal	≈	≈	≈	ARNm CREB	≈	≈	↓
Actividad PLC grupo I	≈	≈	≈	ARNm CREM	≈	≈	↓
Actividad AC basal	≈	≈	≈				
Actividad AC grupo II	≈	≈	≈				
Actividad AC grupo III	≈	≈	≈				

Tabla 11: Resumen de los resultados obtenidos en células C6 expuestas a L-Glu. En esta tabla se exponen gráficamente los resultados numéricos descritos en este capítulo. ≈, no hay variación estadística, ↑, se observa un aumento con respecto a la situación control, ↓, se observa una disminución con respecto a la situación control.

IV.3 Efecto de la hipoxia sobre las células del SNC.

IV.3.1 En cultivos primarios de neuronas de corteza.

Dada la propuesta de algunos autores de que el daño celular ocurrido ante una bajada de oxígeno se podría producir como consecuencia de la liberación de glutamato y su aumento a niveles excitotóxicos, resulta

interesante conocer cuáles serían los efectos de la hipoxia antes de que esto ocurra, con el fin de poder definir con claridad un modelo de daño celular por hipoxia que luego podría servir de campo de pruebas de ligandos destinados a atenuar ese daño. Esto resulta también patente en el sistema de los receptores metabotrópicos de glutamato, en el que los experimentos realizados hasta la fecha no arrojan luz sobre el posible papel neuroprotector o no que puedan desarrollar esta familia de receptores acoplados a proteínas G, especialmente los incluidos en el grupo I.

Para ello se estableció unas condiciones de hipoxia moderada, consistentes en la disminución de la presión parcial de oxígeno hasta un valor de un 5%, valor en el que, según los datos bibliográficos disponibles, empiezan a apreciarse los efectos de la hipoxia producidos por el principal factor de transcripción encargado de mediar sus efectos: el factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α). En estas condiciones se realizaron, sobre cultivos primarios de neuronas corticales de cerebro de rata, ensayos de unión de radioligandos, ensayos de viabilidad, PCR a tiempo real, inmunofluorescencia y ensayos de actividad enzimática con el fin de caracterizar lo mejor posible los cambios que tuvieran lugar en estas condiciones.

a) Viabilidad.

El primer paso consistió en comprobar el efecto ejercido por la exposición de neuronas corticales a la hipoxia moderada en la modulación de la expresión del gen de la caspasa 3, proteína donde convergen las vías apoptóticas de muerte celular.

Como se muestra en la Figura 39, los ensayos de PCR a tiempo real realizados muestran que se produce un incremento de la expresión génica de caspasa 3 a los distintos tiempos ensayados. Este incremento, no obstante, sólo resulta estadísticamente significativo tras 24 horas de exposición a hipoxia moderada ($p < 0,05$), momento en el que la expresión aumenta un 29% sobre la expresión basal. Por otro lado, es destacable que el incremento de expresión observado tras 6 horas de exposición, de un 26%, estuvo cerca de resultar estadísticamente significativo ($p = 0,051$).

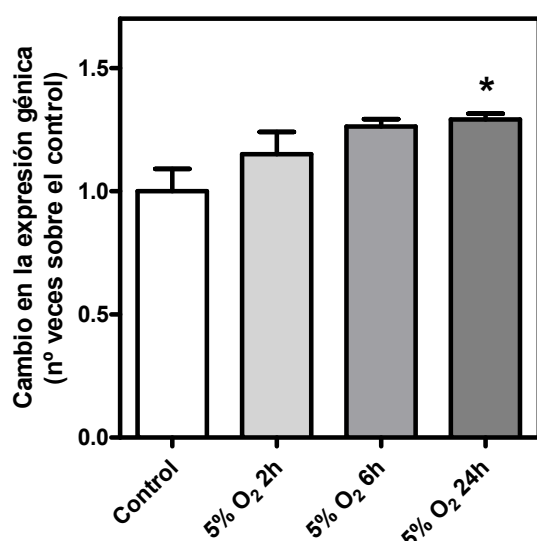


Figura 39: Efecto de la hipoxia moderada sobre la expresión de caspasa 3. Neuronas corticales fueron expuestas a hipoxia moderada durante 2, 6 o 24 horas o se mantuvieron en condiciones control (normoxia) con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando una sonda específica para el gen codificante para la caspasa 3. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$ significativamente diferente con respecto al control.

Una vez comprobado el incremento de la expresión génica de caspasa 3, se procedió a estudiar si este aumento se reflejaba en la viabilidad del cultivo primario sometido a bajas presiones parciales de oxígeno durante 24 horas. Para ello se empleó el ensayo basado en MTT y los resultados obtenidos se exponen en la Figura 40.

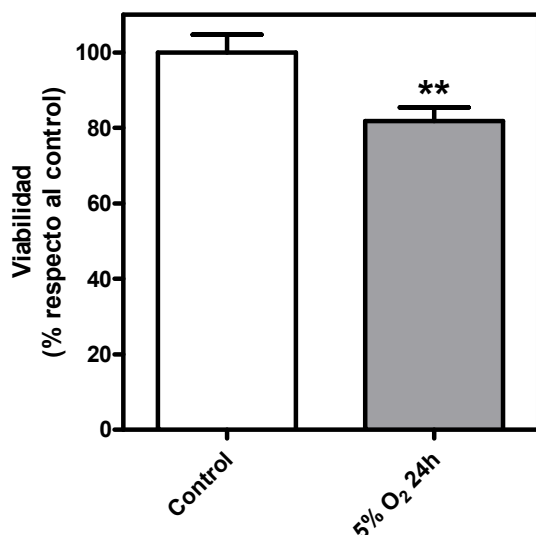
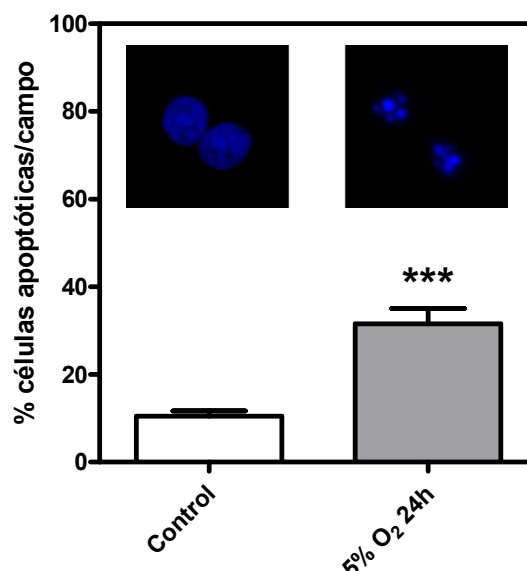


Figura 40: La exposición a hipoxia moderada disminuye la viabilidad celular. Neuronas corticales se expusieron a 5% O₂ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se midió la viabilidad celular mediante el test basado en MTT. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por triplicado, expresados porcentualmente con respecto a la viabilidad de las células controles. ** $p < 0,01$ significativamente diferente con respecto al control.

Como se observa en la mencionada Figura, tras 24 horas de exposición a hipoxia moderada se aprecian procesos de muerte celular en las neuronas corticales *in vitro*. Esta disminución en la viabilidad celular es de un 18%, comparada con neuronas corticales mantenidas en normoxia, y resulta estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

Por último, para comprobar si la muerte celular ocurría por mecanismos apoptóticos, como sugería el aumento de la expresión génica de la caspasa 3, se procedió a evaluar la morfología celular de las neuronas corticales sometidas a bajas presiones parciales de oxígeno y neuronas corticales mantenidas en condiciones normóxicas. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 41, en la que se muestra que la exposición a hipoxia moderada durante 24 horas fomenta la aparición de cuerpos apoptóticos, marcador característico de células apoptóticas (% células apoptóticas: Control: $10,50 \pm 1,22$; 5% O₂ 24h: $31,53 \pm 3,52\%$, $p < 0,001$). Si se calcula la disminución real en la viabilidad en este experimento, entendiendo que todas las células que no presentan cuerpos apoptóticos son viables, se obtiene por este método una disminución en la viabilidad de un 24% con respecto a la situación control, lo que se encuentra en el rango de los resultados obtenidos empleando el test basado en MTT. En la parte superior de la misma figura se muestran dos imágenes en aumento de núcleos normales (izquierda) y cuerpos apoptóticos (derecha).

Figura 41: La exposición a hipoxia moderada desencadena procesos apoptóticos. Neuronas corticales se expusieron a 5% O₂ durante 24 horas o se crecieron en condiciones normóxicas. Transcurrido este tiempo las células se fijaron y se realizó una tinción de la cromatina con Hoechst. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 2 experimentos independientes en los que se contaron una media de 10 campos (20X) por condición, expresados porcentualmente con respecto a la cantidad de células apoptóticas observadas por campo. *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control. En el panel superior se exponen dos muestras de núcleos normales (izquierda) y núcleos apoptóticos (derecha).



Tomados en conjunto, estos resultados apuntan a que las neuronas corticales son sensibles a la disminución, aunque sea moderada, en la presión parcial de oxígeno, desencadenándose procesos de muerte celular por apoptosis.

b) Receptores metabotrópicos de glutamato.

La variación del número total de receptores metabotrópicos de glutamato se midió empleando L-[³H]Glu, tal y como se describe en *Métodos*. Los resultados obtenidos en neuronas corticales sometidas a hipoxia moderada se muestran en la Figura 42 y un resumen se expone a continuación en la Tabla 12.

Como se observa en la Figura 42, panel A, la exposición de neuronas corticales a hipoxia moderada produce un incremento gradual del número de receptores metabotrópicos de glutamato en la superficie celular. Así, se encontraron aumentos en el número de receptores de un 34% tras 2 horas, 95% tras 6 horas y de un 154% después de 24 horas de exposición a hipoxia moderada. De estas variaciones sólo las encontradas a las 6 horas ($p < 0,001$) y a las 24 horas ($p < 0,05$) resultaron ser significativas con respecto a las niveles de receptores detectados en la situación control, mientras que tras 2 horas de exposición no lo fueron ($p = 0,180$).

Por otro lado, al comparar los valores obtenidos a cada uno de los tiempos de exposición entre sí se determinó que las diferencias entre el número de receptores cuantificados tras 2 y 6 horas de exposición eran estadísticamente significativos ($p < 0,05$) y que los grupos de datos obtenidos tras 2 y 24 horas estaban cerca de serlo ($p = 0,133$).

Estos resultados sugieren que el efecto de la hipoxia moderada sobre el número de receptores metabotrópicos de glutamato es gradual y depende del tiempo que se sometan las neuronas corticales a la baja presión parcial de oxígeno, cumpliéndose dentro del rango de tiempos estudiados que, a mayor tiempo de exposición mayor incremento en el número total de receptores metabotrópicos.

En lo que se refiere a la afinidad de los receptores, presentada en el panel B de la misma figura, se observa que la hipoxia moderada no afecta a la afinidad de los receptores metabotrópicos de glutamato por su ligando.

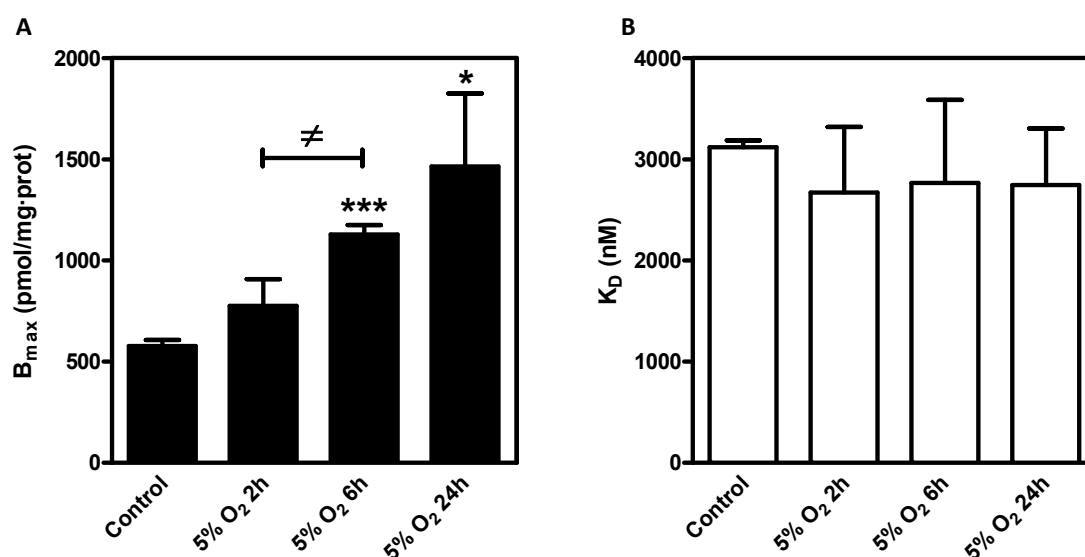


Figura 42: La exposición a hipoxia moderada modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular. Neuronas corticales se expusieron a hipoxia moderada durante 2, 6 o 24 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando L-[³H]Glu. Los datos expuestos son las medias ± SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el software GraphPad Prism 5.0. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control; ^a $p < 0,05$ significativamente diferente con respecto a las 2 horas de exposición.

	Control	5% O ₂ 2h	5% O ₂ 6h	5% O ₂ 24h
$B_{m\acute{a}x}$ (pmol/mg)	577,23 ± 29,41	776,21 ± 132,03	1128,24 ± 46,89 *** ^a	1464,06 ± 360,88 *
K_D (nM)	3117,97 ± 68,73	2672,46 ± 649,11	2767,07 ± 821,50	2744,71 ± 558,96

Tabla 12: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en neuronas corticales expuestas a hipoxia moderada. En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al correspondiente control; ^a $p < 0,05$ significativamente diferente con respecto a las 2 horas de exposición.

Con el fin de comprobar si la regulación de los receptores metabotrópicos afectaba en mayor o menor medida a los distintos subtipos del receptor, se emplearon los anticuerpos específicos disponibles contra los receptores mGlu₁, mGlu₅ y mGlu_{2,3} en ensayos inmunocitoquímicos, como se ha expuesto en *Métodos*. Además, se analizó también el efecto de la hipoxia moderada sobre la cantidad de proteína PLCβ₁, primera enzima de la ruta de transducción de señales activada por el grupo I de receptores metabotrópicos de

glutamato. Dado que la mayor diferencia observada en el número de receptores se encontraba tras 24 horas de exposición a hipoxia, se eligió este tiempo para realizar los ensayos de inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 43.

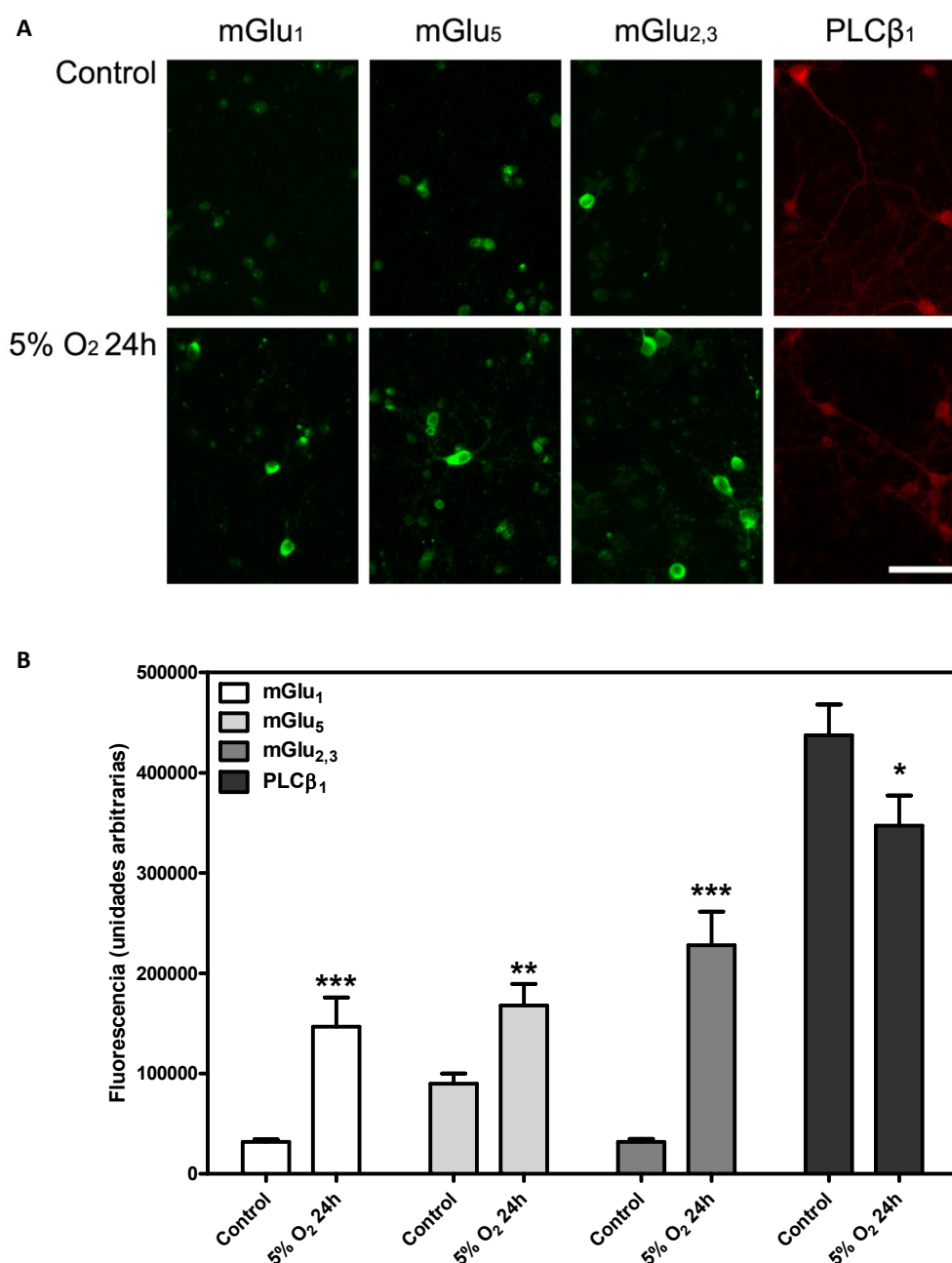


Figura 43: Inmunodetección de mGlu y PLCβ₁ tras la exposición a hipoxia moderada. Panel A. Micrografías representativas de los resultados obtenidos tras los experimentos de inmunofluorescencia al emplear los anticuerpos para mGlu₁, mGlu₅, mGlu_{2,3} y PLCβ₁ en las distintas condiciones experimentales. La barra representa 62 μm. Panel B. Diagrama de barras que resume los resultados expuestos en el panel A. Las cuantificaciones se realizaron usando el *software* LAS AF empleando un mínimo de 30 campos por condición experimental. Se exponen las medias ± SEM obtenidas para cada condición experimental. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 significativamente diferente con respecto al control.

Un resumen de los resultados obtenidos tras la cuantificación y el análisis estadístico de las imágenes obtenidas se expone en la tabla siguiente.

	mGlu ₁	mGlu ₅	mGlu _{2,3}	PLCβ ₁
5% O ₂ 24h	↑***	↑**	↑***	↓*

Tabla 13: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de inmunofluorescencia en neuronas corticales expuestas a hipoxia moderada. Se muestra el sentido de la variación observada con respecto al control mediante flechas: ↑ aumenta; ↓ disminuye. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 significativamente diferente con respecto al control.

Como se aprecia en la Tabla 13, en general, la disminución en la presión parcial de oxígeno produce un aumento significativo de cada uno de los subtipos de receptor metabotrópicos estudiados. Por el contrario, el estudio de la cantidad total de proteína PLCβ₁ demuestra que durante la exposición a hipoxia ocurre una disminución en la cantidad total de proteína.

Con el fin de observar si las diferencias observadas eran producto de variaciones en la expresión génica como consecuencia de la exposición a bajas presiones parciales de oxígeno, se realizaron ensayos de PCR a tiempo real empleando sondas específicas para los genes codificantes para mGlu₁, mGlu₅ y PLCβ₁. Los resultados obtenidos en estos ensayos, que se exponen en la Figura 44, demuestran que, de los genes estudiados, el único regulado como consecuencia de la exposición a hipoxia moderada es el gen codificante para mGlu₁ que, además, varía en sentido contrario a como lo hacen los niveles de proteína. De este modo, se detectaron disminuciones de un 56% tras dos horas de exposición, de un 64% tras 6 horas y de un 50% tras 24 horas, todas ellas estadísticamente significativas (p<0,001).

Estos resultados demuestran que la hipoxia moderada modula de manera específica la expresión del gen mGlu₁, sin afectar a los niveles de ARNm de mGlu₅ ni de PLCβ₁.

Debido a las diferencias observadas en los experimentos de inmunocitoquímica y a la relación existente entre los receptores metabotrópicos del grupo I y la actividad PLC, se realizaron ensayos enzimáticos de dicha actividad en condiciones de privación parcial de oxígeno. En la Figura 45 se muestra la influencia de la hipoxia moderada sobre la actividad PLC basal en neuronas corticales, observándose que no existen diferencias significativas entre las condiciones comparadas (p=0,295) (Control: 26,81 ± 7,27; 5% O₂ 24h: 36,32 ± 3,10 pmol/mg·min).

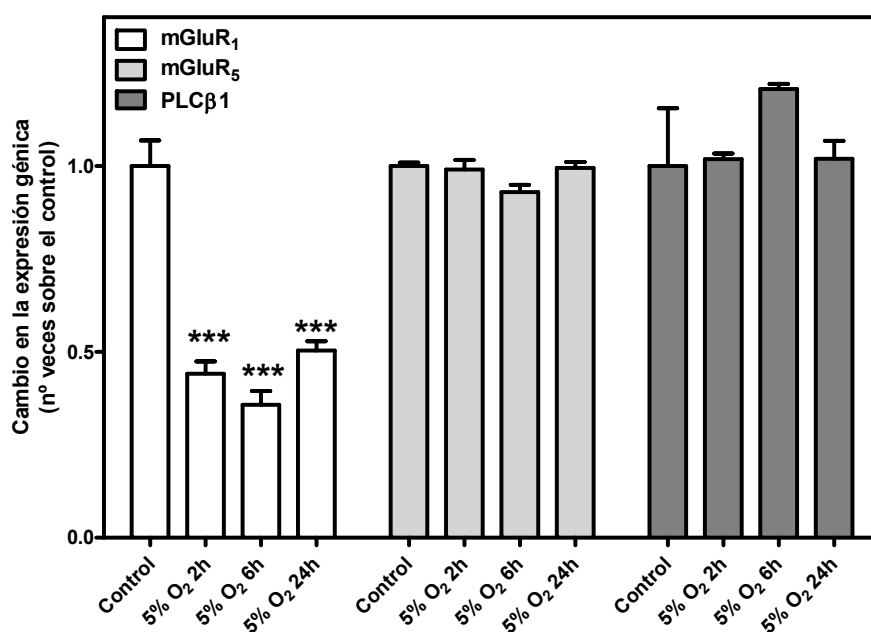
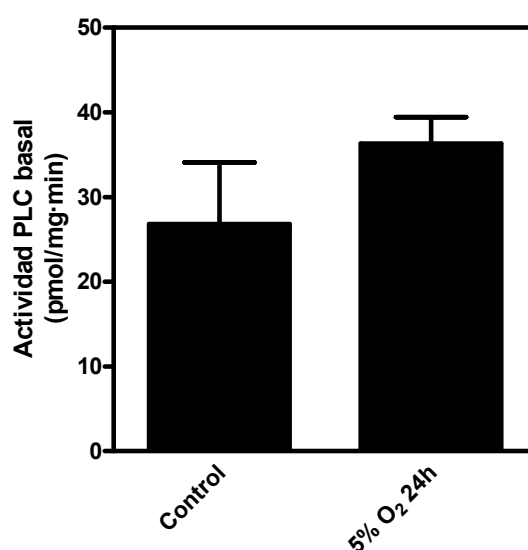


Figura 44: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la expresión génica de mGlu₁, mGlu₅ y PLCβ₁. Neuronas corticales fueron expuestas a 5% O₂ durante 2, 6 o 24 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. *** $p < 0,001$, significativamente diferente con respecto al control.

Figura 45: La exposición a hipoxia moderada no afecta la actividad PLC basal. Neuronas corticales fueron expuestas o no a 5% O₂ durante 24 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de IP₃ basal. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos.



Por otro lado, se estudió también la capacidad de los receptores del grupo I de estimular la actividad PLC, empleando (S)-DHPG como agonista específico de este grupo. Como se aprecia en la Figura 46, en ambas situaciones (S)-DHPG es capaz de estimular la actividad PLC de forma significativa por encima del valor basal (al menos $p < 0,01$), aunque no existen diferencias significativas en la estimulación observada entre ambos grupos (Control: $138,42 \pm 1,26$; 5% O₂ 24h: $132,75 \pm 3,97\%$ del basal).

En la misma figura se aprecia el efecto bloqueante de los antagonistas específicos de los subtipos mGlu₁ y mGlu₅. Tanto en el caso del JNJ 16259685 (antagonista mGlu₁) como en el del MPEP (antagonista mGlu₅) se

observa una reducción considerable sobre las estimulaciones por (S)-DHPG, sin embargo no se aprecian variaciones significativas en cuanto a la capacidad de cada uno de ellos de actuar sobre sus correspondientes dianas.

Los resultados aquí expuestos no permiten afirmar que en neuronas corticales de cerebro de rata el sistema de la PLC se encuentre alterado como consecuencia de la exposición a presiones parciales de oxígeno bajas, a pesar de haber detectado cambios a nivel de la cantidad de proteína de algunos de sus componentes.

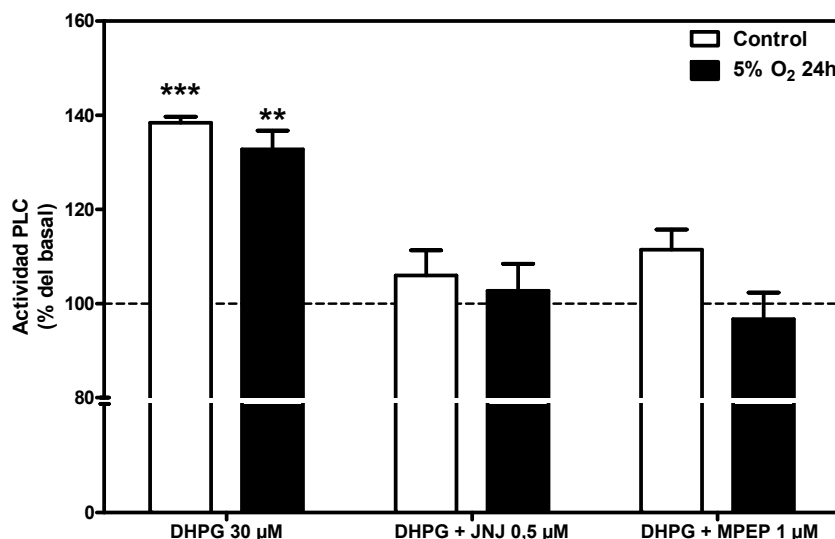


Figura 46: La exposición a 5% O₂ no afecta a la funcionalidad de los receptores metabotrópicos del grupo I. Neuronas corticales fueron expuestas o no a 5% O₂ durante 24 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de IP₃. Se estudió el efecto de la hipoxia moderada sobre la funcionalidad del sistema estimulado por DHPG, agonista del grupo I de los receptores metabotrópicos de glutamato, así como el papel de los subtipos mGlu₁, inhibido por JNJ, y mGlu₅, inhibido por MPEP, en dicha funcionalidad. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, significativamente diferente con respecto a su basal.

Por otro lado, también se estudió el comportamiento del sistema enzimático de la adenilato ciclasa, en condiciones control e hipóxicas, debido a su acoplamiento a los receptores metabotrópicos de los grupos II y III. La actividad basal de la enzima AC en hipoxia no resultaba alterada, como se expone en la Figura 47, panel A (Control: $2,91 \pm 0,60$; 5% O₂ 24h: $2,64 \pm 0,85$ pmol/mg·min).

Como se expone en el panel A, en condiciones basales, la actividad basal de la enzima no varía entre grupos. En el caso de los receptores del grupo II, como se aprecia en el panel B, la vía de transducción mediada por los receptores del grupo II se encuentra potenciada en hipoxia (%inhibición: Control: $42,76 \pm 5,60$; 5% O₂ 24h: $64,58 \pm 3,84$, $p < 0,05$). En lo que respecta a los receptores del grupo III, panel C, se observó también el mismo efecto que en los del grupo II, al detectarse mayor capacidad de inhibición de la actividad AC en hipoxia (% inhibición: Control: $26,53 \pm 3,29$; 5% O₂ 24h: $46,87 \pm 5,79$, $p < 0,05$).

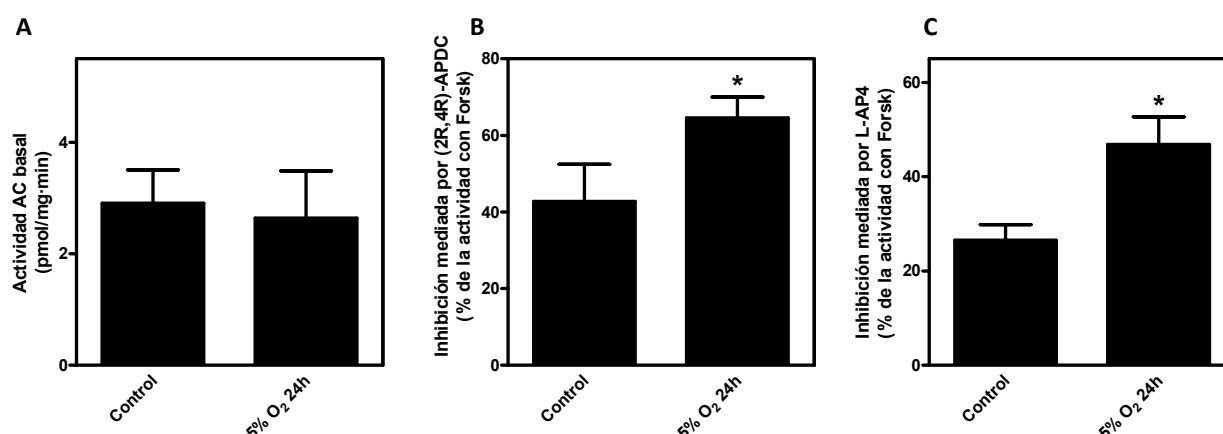


Figura 47: Efecto de la exposición a 5% O₂ sobre la actividad AC. Neuronas corticales fueron expuestas o no a hipoxia moderada durante 24 antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de AMPc. Se estudió el efecto de la exposición hipoxia sobre la actividad AC basal (panel A), así como su efecto sobre la funcionalidad del sistema inhibido por un agonista del grupo II de los receptores metabotrópicos de glutamato, (2R,4R)-APDC 100 μ M (panel B), y por un agonista del grupo III, L-AP4 100 μ M (panel C). En B y C los resultados se expresan como el tanto por ciento de la inhibición observada sobre la estimulación de forskolina 100 nM (Forsk). Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. * $p < 0,05$ significativamente diferente de su correspondiente control. En los ensayos de inhibición ambos grupos resultaron significativamente diferentes con respecto a su condición basal.

De esta manera, se puede concluir que la exposición de neuronas corticales a hipoxia moderada potencia la principal vía de transducción mediada por los receptores metabotrópicos de los grupos II y III, sin que ello afecte a la actividad basal de la propia AC.

Debido a la cantidad de citas bibliográficas que mencionan que la bajada de oxígeno desencadena procesos de liberación de adenosina al medio extracelular, se intentó comprobar si la adición de adenosina al medio de cultivo mimetizaba de alguna manera los efectos observados como consecuencia de la hipoxia moderada. Para ello, se empleó la concentración final de adenosina 1 μ M, la cual inhibía de forma eficiente la transmisión sináptica durante la isquemia en el área CA1 (Pearson y col., 2006), durante 2, 6 y 24 horas y se realizaron ensayos de unión de L-[³H]Glu, ya que fue en estos ensayos en los que la acción de la hipoxia moderada resultó más patente.

Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 48. Como se observa, la exposición a adenosina durante los mismos tiempos que la hipoxia moderada induce cambios similares, aunque no idénticos, sobre los receptores metabotrópicos de glutamato. En cuanto al número total de receptores en la superficie celular, panel A, se observa un incremento significativo (al menos $p < 0,01$) en todos los tiempos estudiados de alrededor de un 200% sobre la expresión basal de estos receptores. En el caso de las afinidades, panel B, lo que se observa es una disminución a la mitad en el parámetro K_D (al menos $p < 0,01$), un aumento por tanto de la afinidad del receptor por su ligando, con respecto a los datos obtenidos en neuronas corticales controles. A continuación de esta figura se expone una tabla resumen (Tabla 14) con los datos obtenidos así como su análisis estadístico.

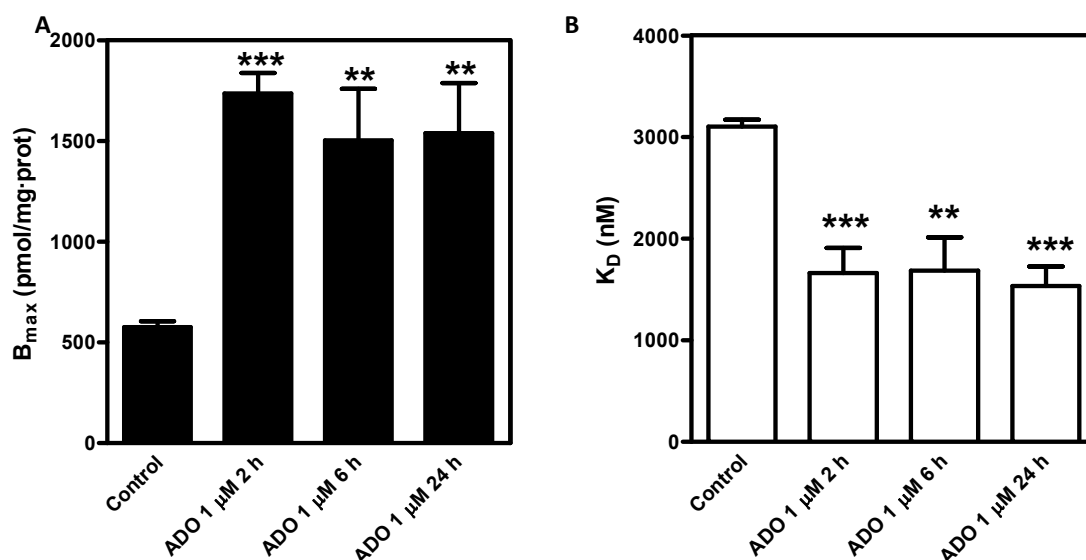


Figura 48: La exposición a adenosina modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular. Neuronas corticales se expusieron a adenosina 1 μ M durante 2, 6 o 24 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando L-[3 H]Glu. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

	Control	Adenosina 1 μ M 2h	Adenosina 1 μ M 6h	Adenosina 1 μ M 24h
$B_{m\acute{a}x}$ (pmol/mg)	577,23 \pm 29,41	1735,73 \pm 101,53 ***	1502,90 \pm 255,87 **	1538,56 \pm 248,86 **
K_D (nM)	3117,97 \pm 68,73	1661,01 \pm 248,53 ***	1685,84 \pm 326,53 **	1533,48 \pm 192,01 ***

Tabla 14: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en neuronas corticales expuestas a adenosina 1 μ M. En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente respecto al correspondiente control.

La comparación de los datos obtenidos durante la hipoxia moderada y durante la exposición de las neuronas corticales a adenosina se expone en la Figura 49. Como se observa, en el caso de las $B_{m\acute{a}x}$, los datos obtenidos se van haciendo más parecidos según avanza el tiempo en ambos grupos de experimentos, siendo incluso estadísticamente diferentes ($p < 0,01$) en el caso de la comparación a 2 horas. Para las afinidades, a pesar de que los datos obtenidos son distintos en la hipoxia moderada y en la exposición a adenosina, la comparación estadística de los mismos no revela diferencias significativas entre ambos.

Si observamos las diferencias entre las B_{max} obtenidas en ambos grupos de experimentos se deduce que durante la hipoxia moderada ocurre una liberación gradual de adenosina, que aparentemente alcanza su liberación máxima a las 24 horas, momento en el que los datos obtenidos en ambos experimentos prácticamente convergen. En lo que se refiere a las afinidades detectadas, se observa que en ambas

situaciones experimentales no hay variaciones de los valores obtenidos para las K_D con respecto al tiempo, lo que sugiere que se activan distintas vías de regulación de la afinidad.

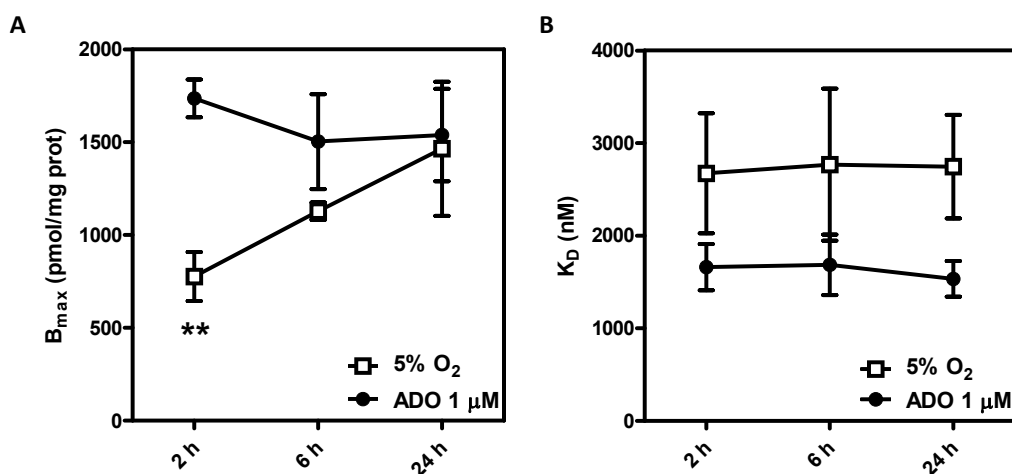


Figura 49: Comparativa entre los parámetros cinéticos obtenidos en los experimentos de unión de radioligando al someter las neuronas corticales a 5% O₂ o a adenosina 1 μM. Los datos expuestos provienen de las Tablas 12 y 14. Comparativa de los valores de B_{max} (panel A) y comparativa de los valores de K_D (panel B). ** p<0,01 valores entre grupos significativamente diferentes.

Un problema que surge cuando se estudian procesos de hipoxia es lo que se ha llamado “la paradoja del oxígeno”. Ésta consiste en que cuando células o tejidos que han estado sometidos a procesos de hipoxia se reoxigenan se desencadenan procesos de muerte celular adicionales, exacerbándose así el daño celular observado durante la hipoxia, problema que resulta especialmente crítico sobre todo a nivel clínico a la hora de tratar episodios de isquemia cerebral.

Por este motivo se comprobó el efecto que pudiera tener la reoxigenación de los cultivos de neuronas corticales sobre los niveles de los receptores metabotrópicos de glutamato. Dado el problema que se quería afrontar se estableció un sistema de reoxigenación consistente en que, tras 6 horas de hipoxia moderada, las células eran devueltas al incubador en condiciones de normoxia una hora antes de realizar los experimentos. Así, se podrían observar los cambios que ocurrirían en periodos cortos de reoxigenación sobre los receptores metabotrópicos de glutamato.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se exponen en la Figura 50. Como se observa en el panel A, la reoxigenación durante 1 hora induce una disminución significativa de los niveles totales de receptores metabotrópicos de glutamato con respecto a los detectados tras 6 horas de hipoxia. En concreto, el valor de B_{máx} detectado es un 52% más elevado que el basal (p<0,001) y un 22% más bajo que el observado tras las 6 horas de exposición a hipoxia (p<0,05).

En lo que se refiere a los valores obtenidos para la afinidad de estos receptores por su ligando, panel B, se observa que tras 1 hora de reoxigenación el valor de K_D disminuía un 74%, con lo que la afinidad resultaba aumentada de forma significativa con respecto a la situación control (p<0,001). Sin embargo, la comparación de valores con los datos obtenidos tras la hipoxia no revelaban variaciones significativas entre sí, a pesar de

detectarse unas disminuciones promedio de un 71% entre ambos grupos de datos, aunque están muy cerca de serlo ($p=0,063$), ello sea probablemente debido a la elevada variabilidad de las K_D en estos experimentos

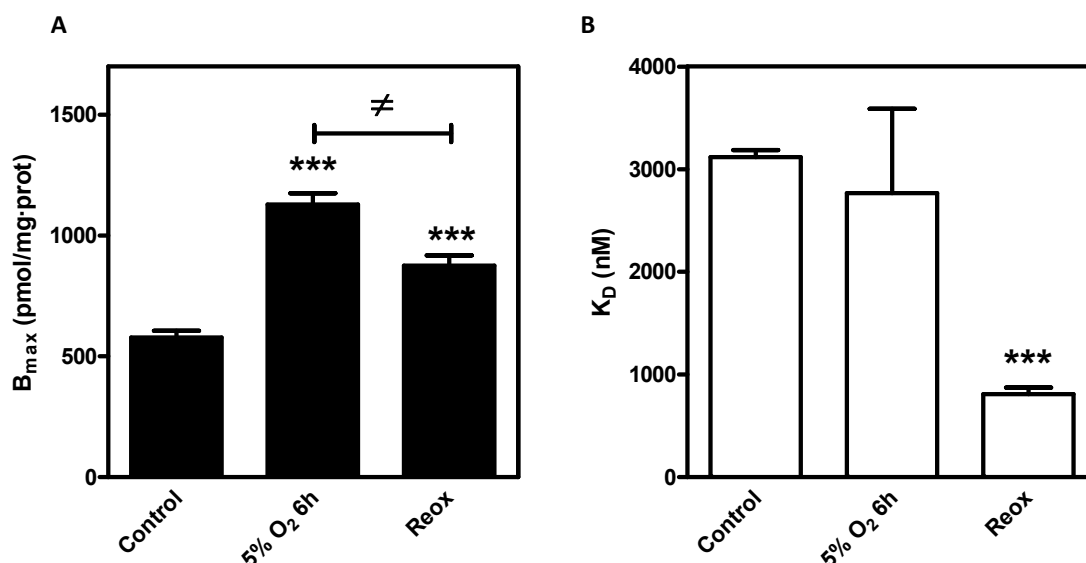


Figura 50: La exposición a hipoxia produce efectos reversibles sobre los receptores metabotrópicos de glutamato. Neuronas corticales se expusieron a hipoxia moderada 6 horas (5% O₂ 6h), transcurridas las cuales se mantuvieron una hora más en condiciones normóxicas (Reox). Transcurrido este tiempo se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando L-[³H]Glu. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control; # $p < 0,05$ valores entre grupos significativamente diferentes.

En la Tabla 15 se muestra un resumen de los datos obtenidos en estos experimentos para el estudio del efecto de la reoxigenación en los niveles de receptores metabotrópicos de glutamato.

	B _{máx} (pmol/mg)	K _D (nM)
5% O ₂ 6h + Reox 1h	876,01 \pm 42,28 *** #	808,02 \pm 65,19 ***

Tabla 15: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en neuronas corticales expuestas a reoxigenación. En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. *** $p < 0,001$ significativamente diferente respecto al correspondiente control; # $p < 0,05$ significativamente diferente respecto a 5% O₂ 6 horas.

Estos resultados sugieren que, durante los procesos de reoxigenación estudiados ocurren fenómenos rápidos en sentido contrario a los descritos durante la hipoxia, ya que, el número total de receptores se acerca a un valor más parecido al obtenido en neuronas corticales controles. Por otro lado, el aumento de afinidad descrito tras la reoxigenación podría ser resultado de una respuesta compensatoria a la disminución del número total de receptores.

c) Receptores de adenosina.

Está firmemente establecido en la bibliografía que durante los procesos de hipoxia/isquemia cerebral aumenta la concentración de adenosina extracelular. Esta adenosina ejerce, en principio, un efecto neuroprotector al activar los receptores A_1 e inhibir la liberación de glutamato. Sin embargo, los procesos de modulación que sufren los receptores de adenosina en estos modelos experimentales están pobremente caracterizados. Por este motivo se empleó la exposición a hipoxia moderada descrita con anterioridad como modelo para estudiar los procesos de modulación que ocurren en los receptores de adenosina, así como en la vía de transducción mediada por el segundo mensajero AMPc, como consecuencia de la disminución parcial de oxígeno.

La determinación de los receptores A_1 , según se describió con anterioridad en *Métodos*, se llevó a cabo a los mismos tiempos que se realizaron los ensayos del apartado anterior. Los resultados se exponen en la Figura 51.

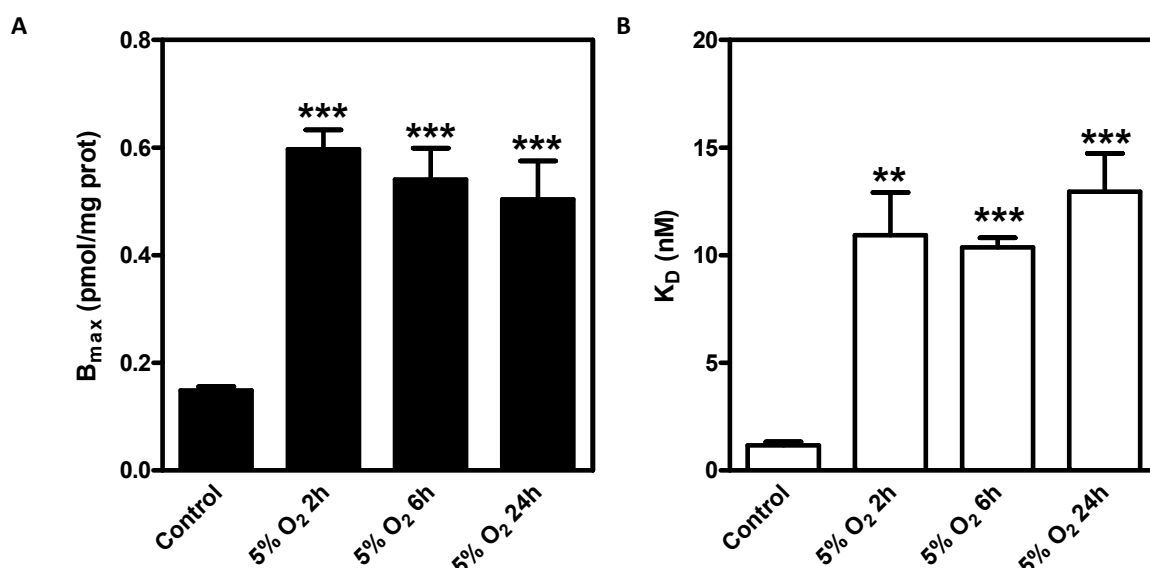


Figura 51: La exposición a hipoxia moderada modula los receptores A_1 en la superficie celular. Neuronas corticales se expusieron a 5% O₂ durante 2, 6 o 24 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [³H]DPCPX. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. ** p<0,01, *** p<0,001 significativamente diferente con respecto al control.

Como se observa en el panel A, la hipoxia moderada produce un aumento significativo (p<0,001) de los receptores A_1 en la superficie celular, cuantificándose incrementos del 301% tras 2 horas, 263% tras 6 horas y 238% tras 24 horas de tratamiento. Por otro lado, la comparación estadística entre grupos no reveló resultados significativos.

En cuanto a la afinidad de los receptores A_1 (panel B) se observa en todos los casos un aumento significativo del parámetro K_D de, aproximadamente, nueve veces sobre la afinidad en la situación control (al

menos $p < 0,01$), lo que lleva aparejada una pérdida de la afinidad de estos receptores por su ligando. De nuevo, el análisis estadístico de los datos entre grupos no reveló variaciones significativas.

A continuación se expone una tabla resumen (Tabla 16) con los datos numéricos obtenidos para cada uno de los parámetros calculados en las distintas situaciones de ensayo.

	Control	5% O ₂ 2h	5% O ₂ 6h	5% O ₂ 24h
B_{máx} (pmol/mg)	0,149 ± 0,006	0,597 ± 0,035 ***	0,541 ± 0,058 ***	0,504 ± 0,071 ***
K_D (nM)	1,16 ± 0,16	10,93 ± 1,98 **	10,36 ± 0,44 ***	12,95 ± 1,77 ***

Tabla 16: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [³H]DPCPX en neuronas corticales expuestas a hipoxia moderada. En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente respecto al correspondiente control.

Estos resultados sugieren que los receptores A₁ de adenosina son extremadamente sensibles a la bajada de oxígeno incluso en condiciones tan suaves como las que engloban nuestro modelo de ensayo.

Por otro lado, se estudió el comportamiento de los receptores A_{2A} en las mismas situaciones por ensayo de unión de radioligando, empleando [³H]ZM241385 como antagonista específico de los receptores A_{2A}. Los resultados obtenidos en estos experimentos se muestran en la Figura 52. Como se observa en el panel A, la exposición de neuronas corticales a hipoxia moderada produce una disminución significativa del número de receptores en la superficie celular, así, a las 2 horas de exposición el número de receptores se había reducido un 34% ($p < 0,05$), a las 6 horas un 39% ($p < 0,01$) y después de 24 horas sólo quedaba el 59% de los receptores iniciales ($p < 0,01$).

Si nos centramos en el estudio de la afinidad (panel B) se observa que la exposición a hipoxia moderada no ejerce efectos notables sobre la afinidad de los receptores A_{2A} por su ligando.

A continuación se expone una tabla resumen (Tabla 17) con los resultados obtenidos en estos experimentos para el receptor A_{2A} en neuronas corticales sometidas a condiciones de hipoxia moderada.

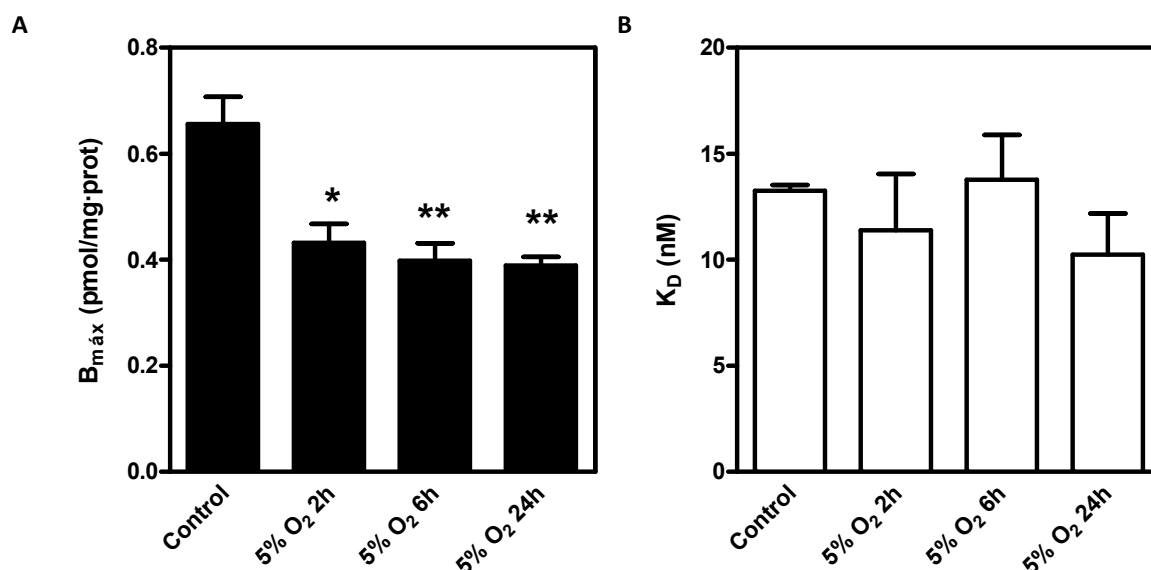


Figura 52: La exposición a hipoxia moderada modula los receptores A_{2A} en la superficie celular. Neuronas corticales se expusieron a 5% O₂ durante 2, 6 o 24 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [³H]ZM241385. Los datos expuestos son las medias ± SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. * p<0,05, ** p<0,01 significativamente diferente con respecto al control.

	Control	5% O ₂ 2h	5% O ₂ 6h	5% O ₂ 24h
B _{máx} (pmol/mg)	0,656 ± 0,051	0,432 ± 0,035 *	0,398 ± 0,033 **	0,389 ± 0,016 **
K _D (nM)	13,25 ± 0,26	11,38 ± 2,65	13,77 ± 2,10	10,24 ± 1,94

Tabla 17: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [³H]ZM241385 en neuronas corticales expuestas a hipoxia moderada. En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. * p<0,05, ** p<0,01 significativamente diferente respecto al correspondiente control.

Estos resultados sugieren que, al igual que ocurría con el receptor A₁, los receptores A_{2A} son muy sensibles a las variaciones en la presión parcial de oxígeno. No obstante, es necesario destacar que los procesos de regulación que sufren A₁ y A_{2A} son opuestos, mientras que los receptores A₁ aumentan su B_{max} y K_D como consecuencia de la exposición a hipoxia moderada, los receptores A_{2A} sólo se ven alterados en su número, que disminuye en estos procesos, resultando inalterada su afinidad.

A continuación se comprobó, mediante PCR a tiempo real, si los cambios observados en ambos tipos de receptores eran consecuencia de modulaciones sufridas a nivel de la expresión génica, como consecuencia de la exposición de las neuronas corticales a hipoxia moderada. De forma adicional se estudió la regulación del gen codificante para el receptor A_{2B} de adenosina.

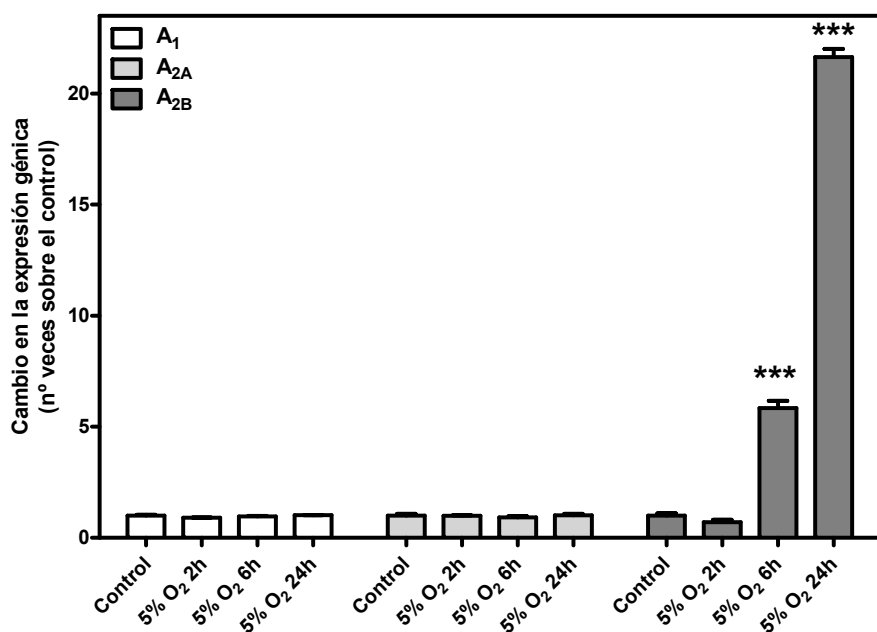


Figura 53: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la expresión génica de A₁, A_{2A} y A_{2B}. Neuronas corticales fueron expuestas a 5% O₂ durante 2, 6 o 24 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. *** $p < 0,001$, significativamente diferente con respecto al control.

Como se aprecia en la Figura 53, no se obtuvo para los genes codificantes para los receptores A₁ y A_{2A}, en ninguna de las condiciones ensayadas, una variación de la expresión génica tal que resultara estadísticamente significativa, lo cual sugiere que es a nivel post-transcripcional donde ocurren los procesos responsables de la modulación de estos receptores a nivel de la membrana plasmática. En el caso del receptor A_{2B} se aprecia, a partir de las 6 horas de exposición, un aumento significativo en la expresión génica de 5,8 veces tras 6 horas ($p < 0,001$) y de 21,6 veces tras 24 horas de exposición ($p < 0,001$).

Este estudio por PCR a tiempo real se amplió a dos familias de genes relacionadas con los receptores de adenosina y con la hipoxia, como son los factores de transcripción constitutivos CREB y CREM y la familia de los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF). Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 54.

En cuanto a los factores de transcripción CREB y CREM, se aprecia que su nivel de ARNm está sensiblemente disminuido a partir de las 6 horas de exposición a hipoxia moderada. Así, en el caso de CREB se aprecian disminuciones de alrededor de un 25% en la expresión génica de este factor ($p < 0,001$), mientras que en el caso de CREM las disminuciones son más acusadas y superan a las 6 y 24 horas el 40% de disminución en la expresión génica de este factor (al menos $p < 0,05$).

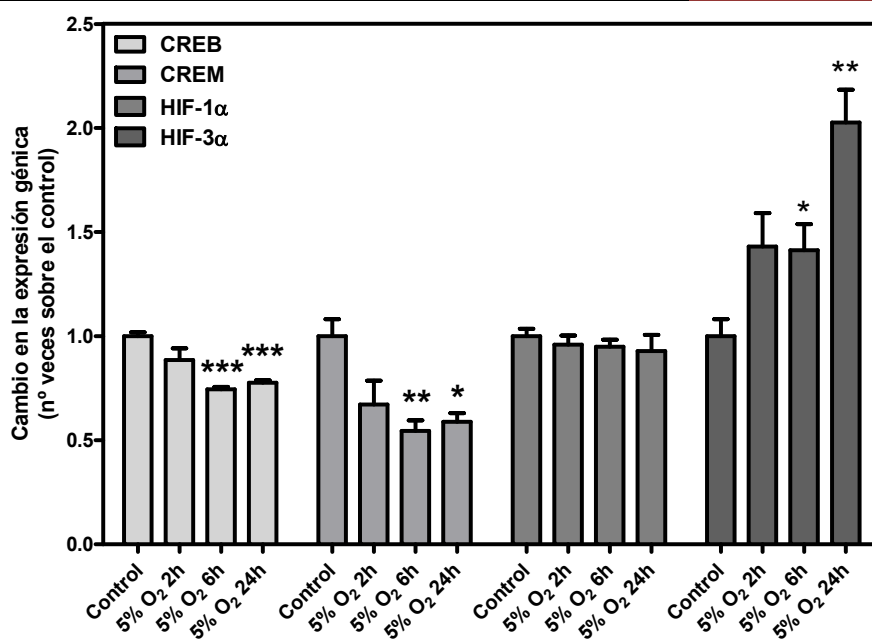


Figura 54: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la expresión génica de los factores HIF-1α, HIF-3α, CREB y CREM. Neuronas corticales fueron expuestas a 5% O₂ durante 2, 6 o 24 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes codificantes para los factores de transcripción mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

En el caso de la familia de los HIF, se aprecia que, en estas condiciones, no se estimula la transcripción génica del factor de transcripción HIF-1α, que debería ser, en principio, el principal responsable de mediar las acciones de la bajada de oxígeno. Además se observa un aumento en la transcripción génica de HIF-3α, cuyo principal cometido parece ser reprimir la activación génica promovida por causa de la hipoxia. El aumento comentado supone unos incrementos de un 43% tras 2 horas de exposición ($p = 0,053$), de un 42% después de 6 horas ($p < 0,05$) y de un 103% tras 24 horas de exposición ($p < 0,01$).

Estos resultados sugieren que la expresión génica de la familia de factores de transcripción relacionados con el AMPc, CREB y CREM, se encuentra disminuida como consecuencia de la exposición de las neuronas corticales a hipoxia moderada. Por otro lado, a falta de confirmación a nivel de expresión proteica, parece que no es HIF-1α el responsable de los efectos observados en este modelo de hipoxia moderada, por dos motivos: por un lado, su expresión génica no aumenta al disminuir la presión parcial de oxígeno y, por otro lado, la expresión génica del principal represor de HIF-1α, HIF-3α, sí que aumenta como consecuencia de la disminución en la presión parcial de oxígeno en las neuronas corticales en cultivo.

Una vez confirmadas experimentalmente las variaciones en la densidad de receptores de adenosina A₁ y A_{2A} a nivel de la membrana plasmática y el estado alterado de los niveles de ARNm de los factores de transcripción CREB y CREM, el siguiente paso debía ser comprobar la capacidad de los receptores A₁ y A_{2A} para transducir una señal a través del sistema enzimático al que están acoplados principalmente. Dado que los

efectos más patentes de la hipoxia moderada se observaban tras 24 horas de exposición de estas células, se eligió este tiempo de exposición para realizar los siguientes ensayos enzimáticos.

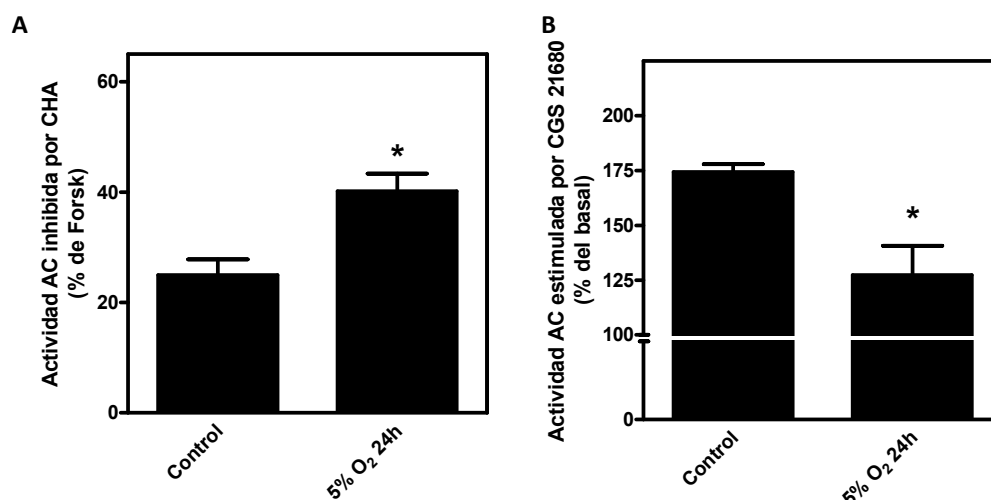


Figura 55: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la actividad AC. Neuronas corticales fueron expuestas o no a 5% O₂ durante 24 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de AMPc. Se estudió el efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la inhibición de la actividad AC por el receptor A₁ (panel A), empleando el agonista específico CHA a 1 μ M para inhibir la actividad estimulada por forskolina 100 nM. También se comprobó el efecto de la excitotoxicidad en la estimulación de la actividad AC promovida por el receptor A_{2A} (panel B), para lo cual se empleó el agonista específico CGS 21680 a 1 μ M. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. * $p < 0,05$ significativamente diferente de su correspondiente control. Actividad basal: Control: $2,91 \pm 0,60$; 5% O₂ 24h: $2,64 \pm 0,85$ pmol/mg·min.

Así, como se expone en el panel A de la Figura 55, en el caso del receptor A₁, como consecuencia de la hipoxia, se observa una mayor capacidad de éste para inhibir la enzima adenilato ciclasa previamente estimulada. Este aumento funcional del receptor A₁ resultaba, además, significativo estadísticamente (% inhibición: Control: $24,95 \pm 2,89$; 5% O₂ 24h: $40,17 \pm 3,19$, $p < 0,05$).

En el caso del receptor A_{2A} los resultados obtenidos se exponen en el panel B de la misma Figura. Como se aprecia, en este caso existe una menor capacidad de los receptores A_{2A} para estimular el sistema de la adenilato ciclasa comparado con la actividad observada en neuronas corticales controles, dato, por otro lado, estadísticamente significativo (% estimulación: Control: $174,33 \pm 3,64$; 5% O₂ 24h: $127,38 \pm 13,33$, $p < 0,05$).

De esta manera queda demostrado que la funcionalidad de los receptores de adenosina A₁ y A_{2A} resulta modulada como consecuencia de la exposición de las neuronas corticales a hipoxia moderada, resultando la funcionalidad del receptor A₁ aumentada y la del A_{2A} disminuida, como en principio cabría esperar debido a las variaciones descritas en la densidad de ambos receptores en la membrana plasmática de estas células.

Al igual que en el apartado anterior, se comprobó el efecto de la exposición a adenosina 1 μ M en neuronas corticales, debido a la relación entre la hipoxia/isquemia y la adenosina descrita con anterioridad. En la Figura 56 se muestran los resultados obtenidos para los ensayos de unión de radioligando para el receptor A₁. Como se observa, la exposición a adenosina aumenta los dos parámetros cinéticos estudiados, la B_{max} y la K_D.

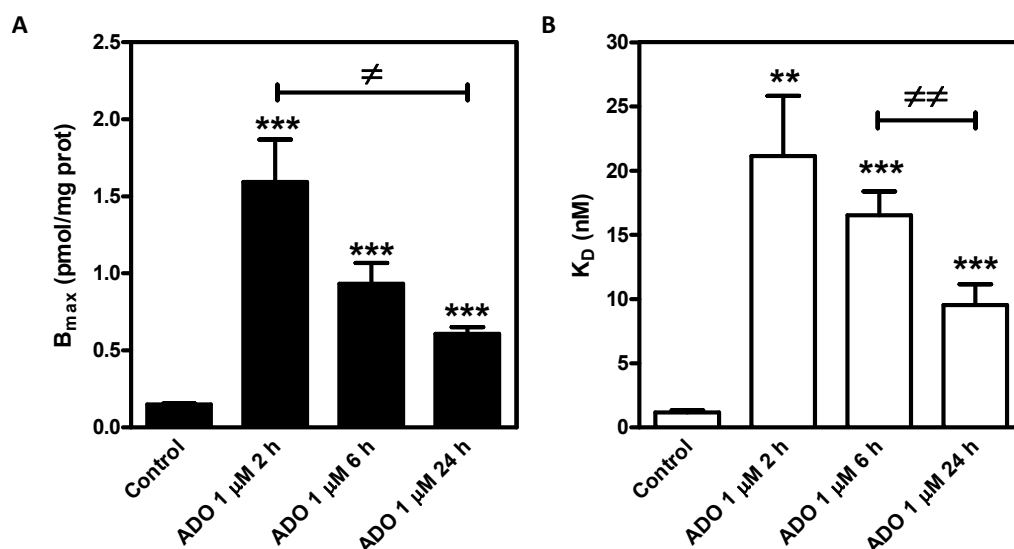


Figura 56: La exposición a adenosina modula los receptores A₁ en la superficie celular. Neuronas corticales se expusieron a adenosina 1 μM durante 2, 6 o 24 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [³H]DPCPX. Los datos expuestos son las medias ± SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. ** p<0,01, *** p<0,001 significativamente diferente con respecto al control; ≠ p<0,05, ≠≠ p<0,01 significativamente diferente entre grupos.

Como se observa en el panel A, la exposición a adenosina induce a tiempos cortos un aumento máximo en el número de receptores A₁ en la superficie celular de 10,7 veces con respecto al control (p<0,001), pasadas 6 horas de exposición el aumento es sólo de 6,3 veces con respecto al control (p<0,001) y tras 24 horas de exposición el aumento es de 4,1 veces con respecto al control (p<0,001), es decir, un mayor tiempo de tratamiento con adenosina no aumentaba proporcionalmente el número de receptores. Por otro lado, la comparación estadística de los datos obtenidos entre grupos, indica que sólo existen diferencias significativas entre los datos obtenidos a 2 y 24 horas (p<0,05). En cuanto al resto de los grupos, la comparación está cercana a ser estadísticamente significativa (p=0,083 entre 2 y 6 horas; p=0,070 entre 6 y 24 horas).

En el caso de las afinidades (panel B) la exposición de neuronas corticales a adenosina produce una disminución significativa de la afinidad en todos los casos. Como se observa, tras 2 horas de exposición la disminución de la afinidad fue de 18 veces con respecto al control (p<0,01), tras 6 horas fue de 14 veces (p<0,001) y tras 24 horas fue de 8 veces (p<0,001). Por otro lado, la comparación entre datos indica que las variaciones observadas entre las exposiciones a 6 y 24 horas son significativas entre sí (p<0,01).

A continuación se expone una tabla resumen (Tabla 18) con los datos obtenidos en estos experimentos.

	Control	Adenosina 1 μ M 2h	Adenosina 1 μ M 6h	Adenosina 1 μ M 24h
B_{\max} (pmol/mg)	0,149 \pm 0,0066	1,594 \pm 0,275 ***	0,932 \pm 0,134 ***	0,607 \pm 0,044 ***
K_D (nM)	1,165 \pm 0,16	21,12 \pm 4,69 **	16,52 \pm 1,85 ***	9,538 \pm 1,61 ***

Tabla 18: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [3 H]DPCPX en neuronas corticales expuestas a adenosina 1 μ M. En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente respecto al correspondiente control.

Posteriormente se compararon estadísticamente los resultados obtenidos tras la exposición a hipoxia moderada y a adenosina 1 μ M. Los resultados obtenidos en esta comparativa se muestran en la Figura 57.

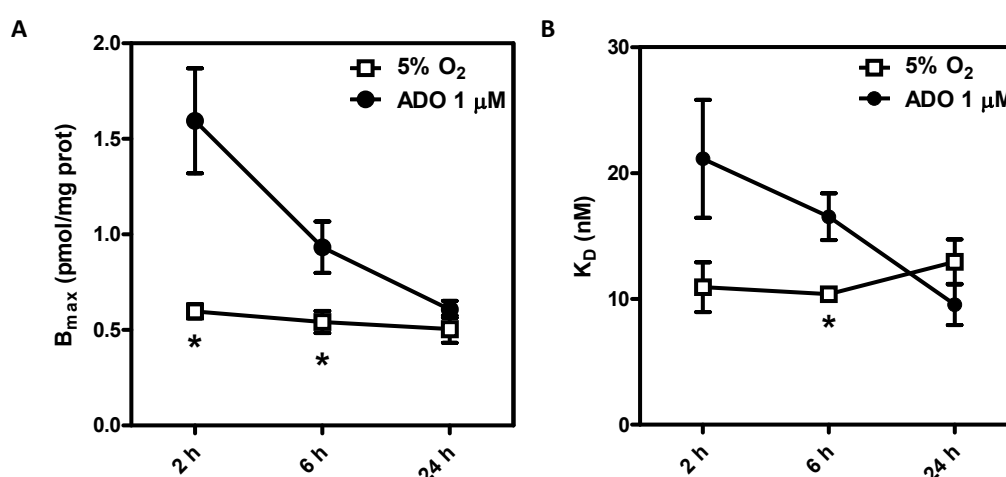


Figura 57: Comparativa entre los parámetros cinéticos obtenidos en los experimentos de unión de radioligando al someter las neuronas corticales a 5% O₂ o bien a adenosina 1 μ M. Los datos expuestos provienen de las Tablas 16 y 18. Comparativa de los valores de B_{\max} (panel A) y comparativa de los valores de K_D (panel B). * $p < 0,05$ valores entre grupos significativamente diferentes.

Como se observa en el panel A, el efecto sobre el número de receptores converge en ambos modelos experimentales a las 24 horas, sin embargo, a tiempos más cortos de exposición, la adenosina induce un incremento del número de receptores mayor que la hipoxia moderada, tanto a 2 como a 6 horas, siendo, además, este incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

En lo que respecta a la afinidad de los mismos (panel B), la comparación de los valores obtenidos desprende las mismas conclusiones que en el caso del número de receptores, con la excepción de que, en este caso, las variaciones en la afinidad obtenidas para ambos grupos a las 2 horas no revelan resultados significativos ($p = 0,116$).

Estos resultados sugieren que la exposición a adenosina produce resultados similares a los producidos por la hipoxia moderada a tiempos largos de exposición, lo que indica que en neuronas corticales la hipoxia moderada induce un aumento gradual de adenosina en el medio extracelular.

En el caso del receptor A_{2A} , la exposición a adenosina $1 \mu\text{M}$ durante los tiempos indicados produce una disminución del número de estos receptores sobre la superficie celular, como se expone en el panel A de la Figura 58. A todos los tiempos ensayados se observaron disminuciones significativas (al menos $p < 0,05$) superiores al 30% en el número de receptores con respecto a la situación control. Por otro lado, la comparación estadística de estos resultados entre los distintos grupos no reveló diferencias.

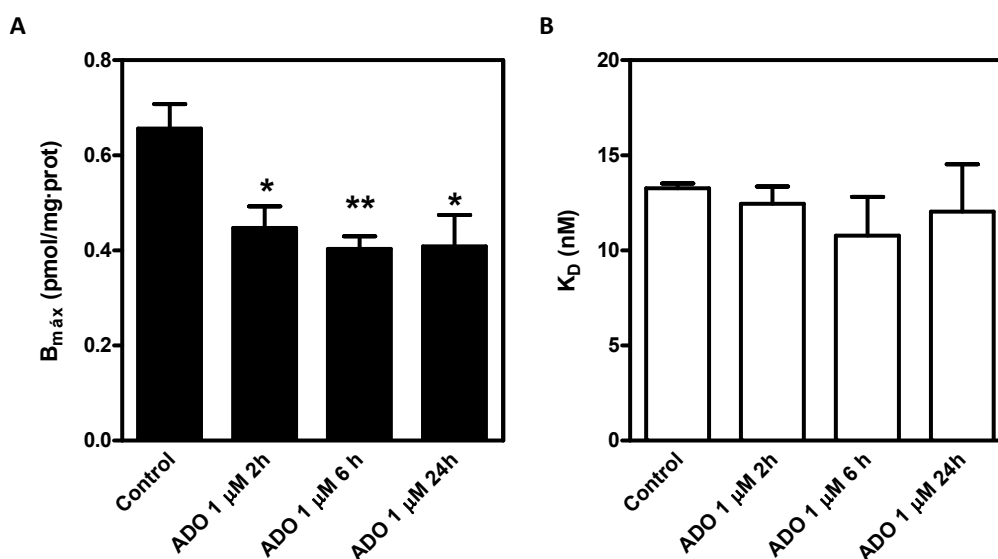


Figura 58: La exposición a adenosina modula los receptores A_{2A} en la superficie celular. Neuronas corticales se expusieron a adenosina $1 \mu\text{M}$ durante 2, 6 o 24 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [^3H]ZM241385. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente con respecto al control.

Del estudio de las afinidades tras la exposición de estas células a adenosina (panel B) se desprende que la afinidad de los receptores A_{2A} en neuronas corticales no resulta afectada como consecuencia de dicha exposición.

A continuación se expone una tabla resumen (Tabla 19) con los datos cinéticos obtenidos en estos experimentos.

	Control	Adenosina 1 μ M 2h	Adenosina 1 μ M 6h	Adenosina 1 μ M 24h
$B_{\text{máx}}$ (pmol/mg)	0,656 \pm 0,051	0,447 \pm 0,045 *	0,403 \pm 0,026 **	0,408 \pm 0,066 *
K_D (nM)	13,25 \pm 0,26	12,44 \pm 0,90	10,78 \pm 2,03	12,02 \pm 2,50

Tabla 19: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [3 H]ZM241385 en neuronas corticales expuestas a adenosina 1 μ M. En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente respecto al correspondiente control.

La comparación de los datos cinéticos obtenidos en estos experimentos para el receptor A_{2A} con los obtenidos tras la exposición a hipoxia moderada se expone en la Figura 59. Como se observa en esta Figura no existen diferencias apreciables entre el resultado observado tras someter a las neuronas corticales a una u otra situación.

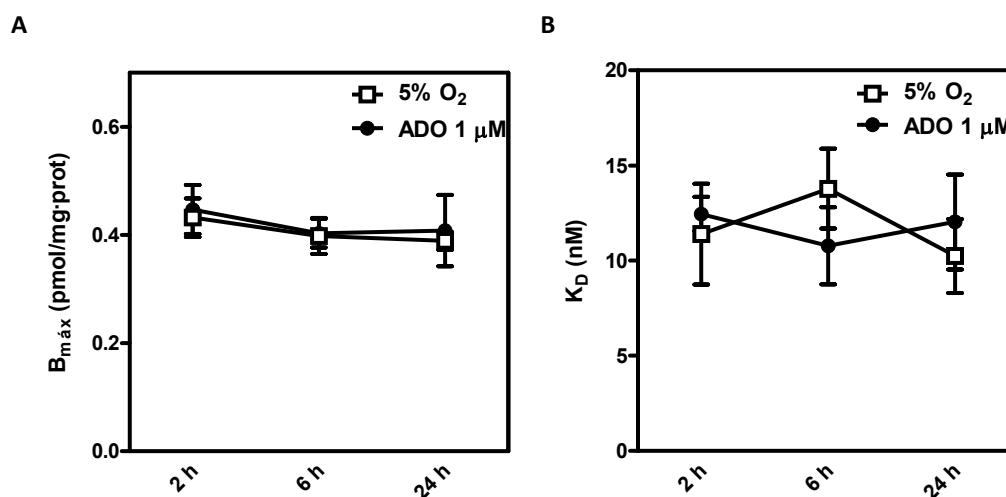


Figura 59: Comparativa entre los parámetros cinéticos obtenidos en los experimentos de unión de radioligando al someter las neuronas corticales a 5% O_2 o bien a adenosina 1 μ M. Los datos expuestos devienen de las Tablas 17 y 19. Comparativa de los valores de $B_{\text{máx}}$ (panel A) y de los valores de K_D (panel B).

Estos resultados sugieren que los receptores A_{2A} se comportan igual bajo la influencia de la adenosina 1 μ M que bajo la influencia de la hipoxia moderada. Si comparamos estos resultados con los obtenidos para el receptor A_1 se observa que éste es más susceptible de ser regulado por pequeñas variaciones en la concentración de adenosina, mientras que el receptor A_{2A} parece responder igual ante cualquier estímulo que suponga liberación de adenosina, lo que hace al receptor A_1 candidato a orquestar las respuestas celulares frente a variaciones en la concentración de adenosina.

Al igual que en el apartado anterior, se estudió si los efectos observados en los parámetros cinéticos de los receptores A_1 y A_{2A} como consecuencia de la exposición a hipoxia eran reversibles o no. Para ello, las neuronas corticales se sometieron a hipoxia moderada durante dos horas, tiempo suficiente para observar

modulación en los parámetros cinéticos de ambos receptores, y después se mantuvieron durante una hora en condiciones normóxicas antes de realizar los ensayos de unión de radioligandos.

Los resultados obtenidos para el receptor A_1 se exponen en la Figura 60. En el panel A se observa que el aumento de receptores A_1 observado durante la hipoxia disminuye tras la reoxigenación. De esta manera se aprecia una disminución significativa en el número de receptores totales con respecto a los detectados durante la hipoxia moderada de un 34% ($p<0,05$), aunque este número sigue siendo 2,6 veces superior a la B_{max} detectada en neuronas corticales controles ($p<0,01$).

En el caso de la afinidad del receptor A_1 (panel B), se aprecia el mismo efecto que el descrito anteriormente, el parámetro K_D tras la reoxigenación sigue siendo más elevado que el control, en concreto 3,7 veces ($p<0,05$), pero es a la vez estadísticamente menor, un 60%, que el descrito para la hipoxia moderada ($p<0,05$).

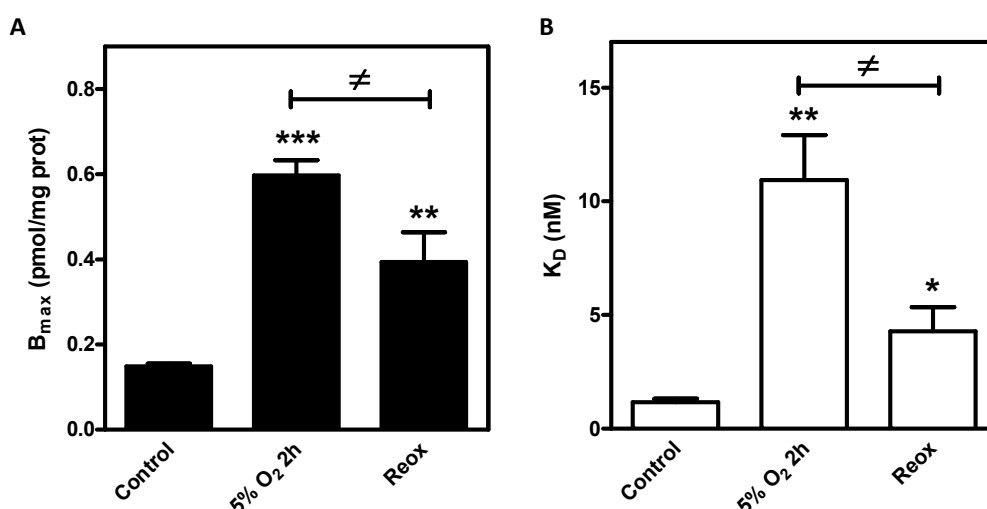


Figura 60: La exposición a hipoxia produce efectos reversibles sobre los receptores A_1 de adenosina. Neuronas corticales se expusieron a hipoxia moderada 2 horas (5% O_2 2h), transcurridas las cuales se mantuvieron una hora más en condiciones normóxicas (Reox). Transcurrido este tiempo se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [3H]DPCPX. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ significativamente diferente con respecto al control; ≠ $p<0,05$ valores entre grupos significativamente diferentes.

En el caso del receptor A_{2A} , los resultados se exponen en la Figura 61. Como se aprecia, y al contrario de lo que ocurría para el estudio del receptor A_1 , una hora de reoxigenación no es suficiente para observar variaciones en los parámetros cinéticos estudiados: número total de receptores (panel A) y afinidad de los mismos (panel B).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que el receptor A_1 sea más susceptible de ser regulado por las concentraciones de adenosina y, de alguna manera, pueda controlar el comportamiento del receptor A_{2A} .

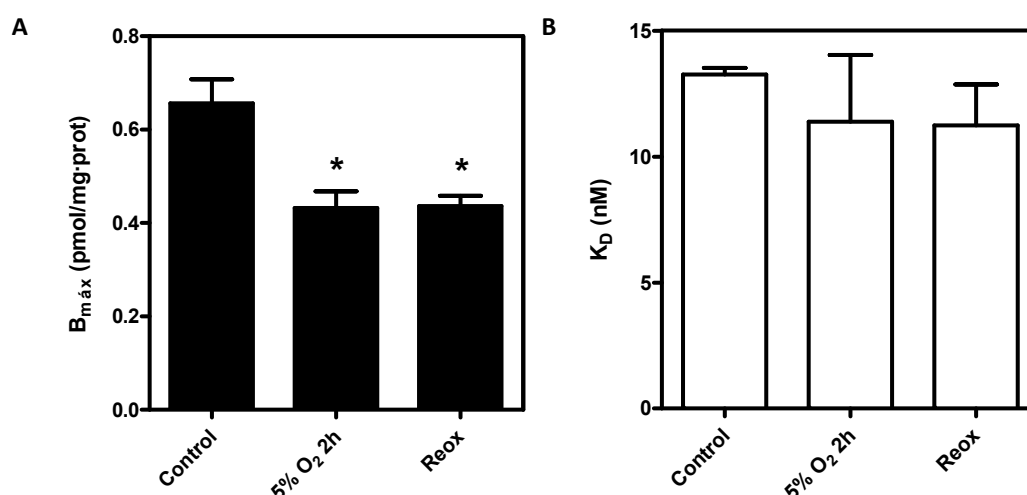


Figura 61: La exposición a hipoxia no produce efectos reversibles sobre los receptores A_{2A} de adenosina. Neuronas corticales se expusieron a hipoxia moderada 2 horas (5% O₂ 2h), transcurridas las cuales se mantuvieron una hora más en condiciones normóxicas (Reox). Transcurrido este tiempo se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [³H]DPCPX. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control; \neq $p < 0,05$ valores entre grupos significativamente diferentes.

A continuación se expone una tabla con los parámetros cinéticos obtenidos para ambos receptores en estos experimentos, así como el análisis estadístico de los mismos.

5% O ₂ 2h + Reox 1h	B_{max} (pmol/mg)	K_D (nM)
A_1	$0,394 \pm 0,069$ ** \neq	$4,28 \pm 1,06$ * \neq
A_{2A}	$0,436 \pm 0,022$ *	$11,23 \pm 1,63$

Tabla 20: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos para los receptores de adenosina en neuronas corticales expuestas a reoxigenación. En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente respecto al correspondiente control. \neq $p < 0,05$ significativamente diferente con respecto a 5% O₂ 2 horas.

d) Tabla resumen.

A continuación se exponen dos tablas a modo de resumen con las principales variaciones observadas en los experimentos descritos en este apartado. La primera (Tabla 21) recoge las variaciones observadas en los experimentos empleando 5% O₂, en la segunda (Tabla 22) en los que se empleó adenosina.

	5% O ₂ 2h	5% O ₂ 6h	5% O ₂ 24h		5% O ₂ 2h	5% O ₂ 6h	5% O ₂ 24h
Viabilidad			↓	B _{max} unión [³ H]DPCPX	↑	↑	↑
Muerte apoptótica			↑	K _D unión [³ H]DPCPX	↑	↑	↑
ARNm caspasa 3	≈	≈	↑	B _{max} unión [³ H]ZM241385	↓	↓	↓
B _{max} unión L-[³ H]Glu	≈	↑	↑	K _D unión [³ H]ZM241385	≈	≈	≈
K _D unión L-[³ H]Glu	≈	≈	≈	ARNm A ₁	≈	≈	≈
Proteína mGlu ₁			↑	ARNm A _{2A}	≈	≈	≈
ARNm mGlu ₁	↓	↓	↓	ARNm A _{2B}	≈	↑	↑
Proteína mGlu ₅			↑	ARNm HIF-1α	≈	≈	≈
ARNm mGlu ₅	≈	≈	≈	ARNm HIF-3α	≈	↑	↑
Proteína mGlu _{2,3}			↑	ARNm CREB	≈	↓	↓
Proteína PLCβ ₁			↓	ARNm CREM	≈	↓	↓
ARNm PLCβ ₁	≈	≈	≈	Actividad A ₁ /AC			↑
Actividad PLC basal			≈	Actividad A _{2A} /AC			↓
Actividad PLC grupo I			≈	B _{max} [³ H]DPCPX (1h Reox)	≠		
Actividad AC basal			≈	K _D [³ H]DPCPX (1h Reox)	≠		
Actividad AC grupo II			↑	B _{max} [³ H]ZM241385 (1h Reox)	≈		
Actividad AC grupo III			↑	K _D [³ H]ZM241385 (1h Reox)	≈		
B _{max} L-[³ H]Glu (1h Reox)		≠					
K _D L-[³ H]Glu (1h Reox)		≠					

Tabla 21: Resumen de los resultados obtenidos en neuronas corticales expuestas a hipoxia. En esta tabla se exponen gráficamente los resultados numéricos descritos en este capítulo. ≈, no hay variación estadística, ↑, se observa un aumento con respecto a la situación control, ↓, se observa una disminución con respecto a la situación control.

	Ado 1 μ M 2h	Ado 1 μ M 6h	Ado 1 μ M 24h
B _{max} unión L-[³ H]Glu	↑	↑	↑
K _D unión L-[³ H]Glu	↓	↓	↓
B _{max} unión [³ H]DPCPX	↑	↑	↑
K _D unión [³ H]DPCPX	↑	↑	↑
B _{max} unión [³ H]ZM241385	↓	↓	↓
K _D unión [³ H] ZM241385	≈	≈	≈

Tabla 22: Resumen de los resultados obtenidos en neuronas corticales tratadas con adenosina. En esta tabla se exponen gráficamente los resultados numéricos descritos en este capítulo. ≈, no hay variación estadística, ↑, se observa un aumento con respecto a la situación control, ↓, se observa una disminución con respecto a la situación control.

IV.3.2 En células C6 de glioma de rata.

En la actualidad existen algunas referencias bibliográficas que relacionan los receptores metabotrópicos de glutamato como posibles mediadores de la neuroprotección/neurodegeneración en modelos de hipoxia e isquemia. Sin embargo, ninguno de estos estudios comprende la demostración de los procesos de regulación que sufren estos receptores como consecuencia de la disminución de la presión parcial de oxígeno. En este apartado se desarrollará una primera aproximación a los procesos de regulación que sufren estos receptores tras la exposición a hipoxia moderada en células C6. Para ello se eligió el mismo modelo de hipoxia moderada empleado en neuronas, consistente en la disminución en la presión parcial de oxígeno hasta un 5% durante 2, 6 o 24 horas. Después se realizarían ensayos de unión de radioligando, experimentos de RT-PCR a tiempo real y ensayos de actividad enzimática con el fin de intentar dilucidar los mecanismos de regulación que sufren estos receptores ante la exposición a hipoxia moderada en células gliales.

a) Efecto en la viabilidad celular.

Los primeros experimentos se encaminaron a observar los efectos que ejercía esta hipoxia moderada sobre la viabilidad celular en células C6, para ello se recurrió al test de viabilidad basado en el MTT. Como se observa en la Figura 62, la exposición de las células C6 a una disminución moderada en la presión parcial de oxígeno, no afecta a la viabilidad celular a ninguno de los tiempos ensayados (% viabilidad: Control: 100,00 ± 0,95; 5% O₂ 2h: 100,01 ± 5,48; 5% O₂ 6h: 96,55 ± 5,66; 5% O₂ 24h: 98,00 ± 11,88).

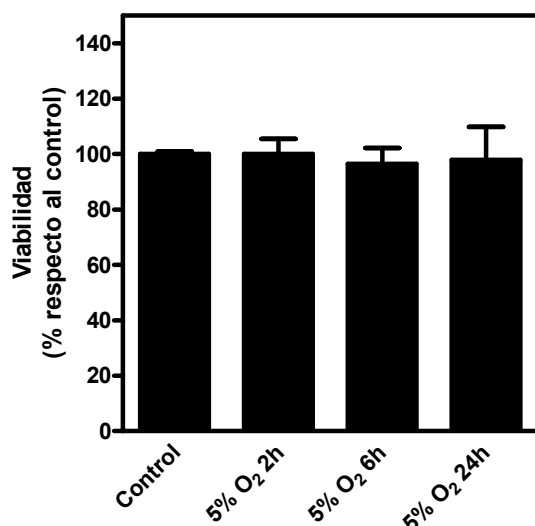


Figura 62: Las células C6 resisten la bajada en la disponibilidad de oxígeno. Células C6 se expusieron a 5% O₂ durante 2, 6 y 24 horas. Transcurrido este tiempo se midió la viabilidad celular mediante el test basado en MTT. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por triplicado, expresados porcentualmente con respecto a la viabilidad de las células controles.

b) Receptores metabotrópicos de Glutamato.

A continuación se realizó un estudio completo de la modulación de los receptores metabotrópicos de glutamato como consecuencia de la disminución en la presión parcial de O₂. Como se observa en la Figura 63, la disminución de la presión parcial de oxígeno, incluso durante tiempos tan cortos como dos horas, modula la expresión de los receptores metabotrópicos de glutamato en la superficie celular de la línea C6, afectando tanto a la cantidad de receptores como a la afinidad de los mismos por su ligando. Así, se aprecia un aumento significativo del número total de receptores metabotrópicos (panel A), el cual es de un 138% tras dos horas de hipoxia moderada, de un 132% después de 6 horas y de un 123% tras las 24 horas, con respecto al número de receptores medidos en situación control.

Los resultados obtenidos demostraban que la afinidad de los receptores metabotrópicos por su ligando disminuía de forma significativa como consecuencia de la hipoxia (panel B). Así, se han descrito aumentos en la K_D de 2,9, 3 y 2,4 veces tras 2 horas, 6 y 24 horas de hipoxia moderada, respectivamente, en comparación con la situación control. Los datos obtenidos para los ensayos de unión de L-[³H]Glu, así como el análisis estadístico de los mismos, se expone en la tabla 23.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en las exposiciones a hipoxia moderada a distintos tiempos, reveló que no existían diferencias significativas entre ellos, es decir, los cambios detectados a nivel de número de receptores y de su afinidad detectados a las dos horas de exposición se mantenían en el tiempo a lo largo de todo el estudio.

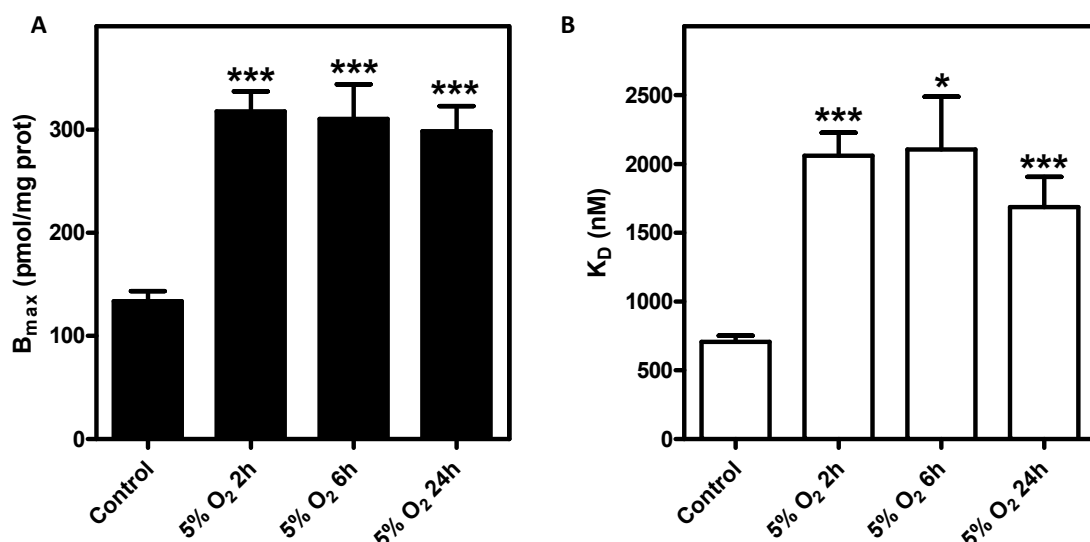


Figura 63: La exposición a hipoxia moderada modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular. Células C6 se expusieron a hipoxia durante 2, 6 o 24 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando L-[³H]Glu. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando células de diferentes pases. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. * p<0,05, *** p<0,001 significativamente diferente con respecto al control.

	Control	5% O ₂ 2h	5% O ₂ 6h	5% O ₂ 24h
B _{máx} (pmol/mg)	133,75 \pm 9,54	317,66 \pm 19,26 ***	310,28 \pm 33,41 ***	298,33 \pm 24,37 ***
K _D (nM)	707,59 \pm 44,45	2058,41 \pm 169,39 ***	2103,56 \pm 384,82 *	1687,13 \pm 219,70 ***

Tabla 23: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en células C6 expuestas a hipoxia moderada. En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. * p<0,05, *** p<0,001 significativamente diferente respecto al correspondiente control.

Con el fin de estudiar más a fondo el sistema de transducción mediado por los receptores del grupo I, se estudió por PCR a tiempo real los efectos que ejercía la hipoxia moderada a los distintos tiempos de exposición en células C6 sobre los genes codificantes para el receptor mGlu₁ y para la enzima PLCβ₁. Los resultados obtenidos tras estos experimentos se exponen en la Figura 64.

Como se observa, a pesar de no haberse detectado diferencias en la modulación del número total de receptores entre los distintos tiempos de hipoxia, en el caso del gen codificante para mGlu₁ se aprecia un aumento progresivo de su expresión con el tiempo de exposición a la hipoxia moderada, aunque sólo resultan significativos desde un punto de vista estadístico tras 24 horas de tratamiento (p<0,05). Porcentualmente estos aumentos se traducen en incrementos del 7%, 32% y 108%, tras 2, 6 y 24 horas de exposición, respectivamente. Por otro lado, la comparación estadística de las variaciones en la expresión génica observadas entre los distintos tratamientos revela diferencias significativas entre los datos obtenidos a 2 y a 24 horas de

hipoxia moderada ($p < 0,05$) y proporciona un valor de $p = 0,144$ a la comparación de los datos obtenidos tras 6 y 24 horas de exposición. Por todo ello se puede afirmar que la hipoxia moderada produce un aumento gradual de la expresión del gen codificante para el receptor $mGlu_1$.

Sin embargo, la hipoxia moderada no produce ninguna variación significativa en la expresión génica de una enzima relacionada directamente con el receptor $mGlu_1$ y con la transducción de la señal mediada por éste, como es la $PLC\beta_1$, como se observa en la Figura 64.

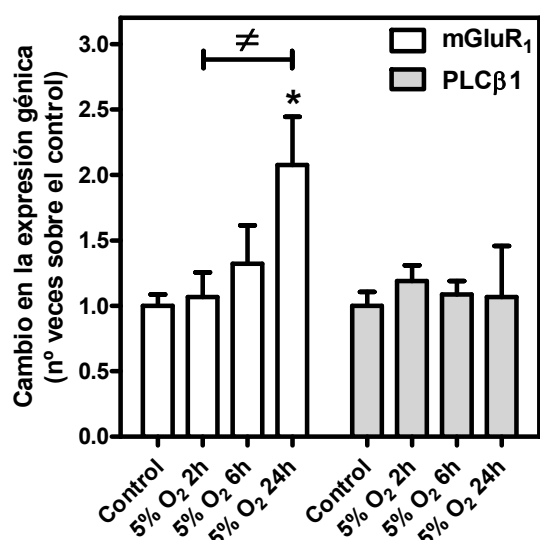
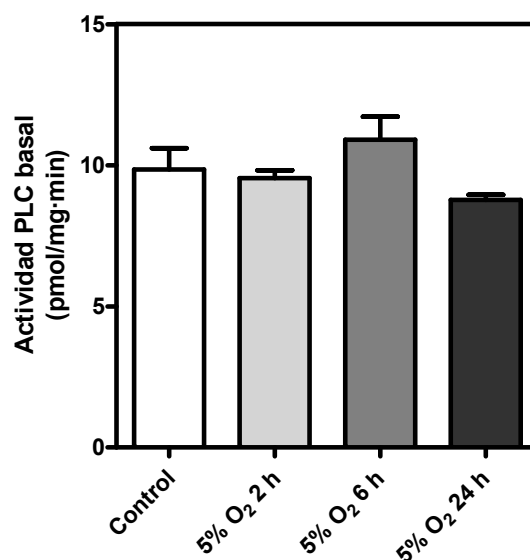


Figura 64: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la expresión génica de $mGlu_1$ y $PLC\beta_1$. Células C6 fueron expuestas a 5% O₂ durante 2, 6 o 24 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$, significativamente diferente con respecto al control.

Dado el aumento observado en la expresión génica de $mGlu_1$, a pesar de no observar cambios significativos en la expresión de $PLC\beta_1$ que sugirieran que el sistema de transducción mediado por los receptores del grupo I pudiera estar alterado, se realizaron ensayos enzimáticos de actividad PLC en células controles y expuestas a hipoxia moderada.

Como se observa en la Figura 65, la hipoxia moderada no produjo ningún efecto considerable en la actividad PLC basal (Control: $9,85 \pm 0,75$; 5% O₂ 2h: $9,54 \pm 0,28$; 5% O₂ 6h: $10,90 \pm 0,82$; 5% O₂ 24h: $8,77 \pm 0,18$ pmol/mg·min).

Figura 65: La exposición a hipoxia moderada no afecta la actividad PLC basal. Células C6 fueron expuestas o no a 5% O₂ durante 2, 6 o 24 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de IP₃ basal. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos pases.



A pesar de ello se comprobó si la capacidad de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I de activar la enzima PLC se veía alterada en estas condiciones. Así, como se expone en la Figura 66, no se aprecian diferencias significativas en la capacidad de L-glutamato, agonista de todos los mGlu, ni en la de (1S,3R)-ACPD, agonista de los grupos I y II, de estimular el sistema de la PLC en células controles y en las sometidas a la hipoxia moderada. En todos los casos expuestos, la estimulación de la PLC observada era estadísticamente significativa con respecto a su valor basal medido (al menos, $p < 0,05$).

Estos resultados indican que, a pesar de los cambios observados a nivel del número total de receptores en la superficie celular y de los detectados en la expresión génica del receptor mGlu₁, no se observan diferencias significativas en la capacidad del sistema de los receptores metabotrópicos del grupo I de transducir la señal, entendiéndose ésta como un aumento de la hidrólisis del fosfatidil-inositoles.

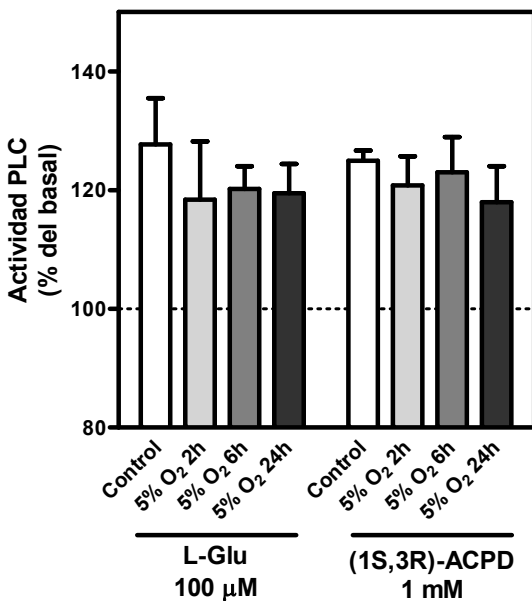


Figura 66: La exposición a 5% O₂ no afecta a la funcionalidad de los receptores metabotrópicos del grupo I. Células C6 fueron expuestas o no a 5% O₂ durante 24 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de IP₃. Se estudió el efecto de la hipoxia moderada sobre la funcionalidad del sistema estimulado por L-Glu 100 μM, agonista endógeno de los receptores metabotrópicos, así como por (1S,3R)-ACPD 1 mM, agonista de los grupos I y II de los receptores metabotrópicos de glutamato. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos pases.

Como se ha comentado con anterioridad existen múltiples referencias bibliográficas al aumento en la cantidad de adenosina en el medio extracelular como consecuencia de los procesos de hipoxia, por ello se intentó comprobar si el efecto observado de la hipoxia moderada sobre el número total de receptores metabotrópicos de glutamato era debido a un aumento en la cantidad de adenosina del medio extracelular. Del mismo modo que en los cultivos primarios de neuronas se añadió adenosina 1 μM a las células C6 en condiciones normóxicas durante 2, 6 y 24 horas. Los datos obtenidos en los ensayos de unión de L-[³H]Glu se exponen en la Figura 67.

Los resultados obtenidos tras los tratamientos con adenosina en condiciones normóxicas proporcionan valores similares a los observados en condiciones de hipoxia moderada. En concreto, se aprecia un aumento significativo del número total de receptores a nivel de la membrana plasmática que se concreta en un incremento de un 116% tras 2 horas, un 109% tras 6 horas y de un 106% tras las 24 horas de tratamiento. Por otro lado, la afinidad de los receptores sobre su ligando también se ve alterada como consecuencia del tratamiento de las células C6 con adenosina, así se observa que el parámetro K_D aumenta de forma significativa 3,3 veces tras 2 horas de tratamiento, 3,2 veces tras 6 horas y 3 veces tras las 24 horas sobre el valor detectado

en condiciones basales. La comparación estadística de los valores obtenidos para el parámetro B_{\max} y K_D en los distintos tratamientos con adenosina revela que no existen diferencias significativas entre ellos.

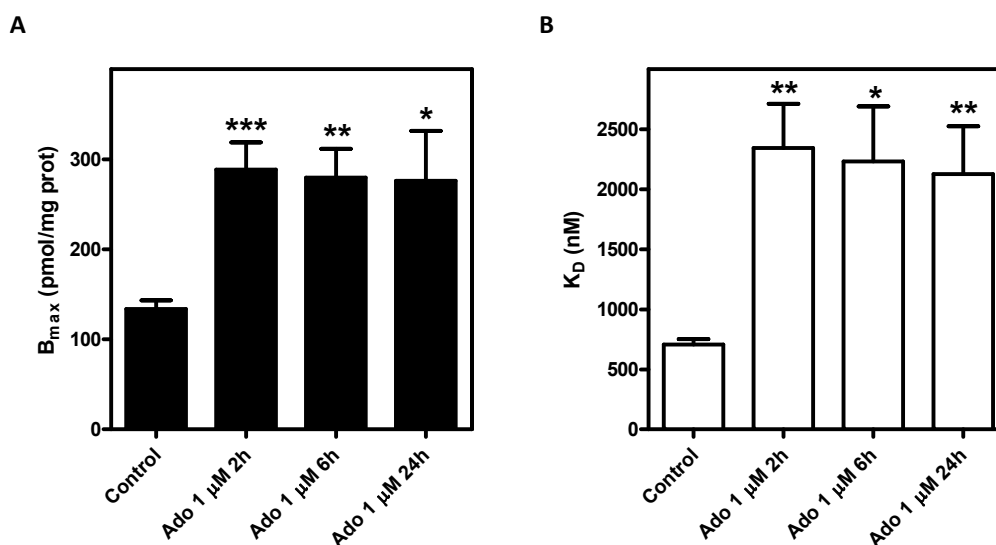


Figura 67: La exposición a adenosina modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular. Células C6 se expusieron a adenosina 1 μ M durante 2, 6 o 24 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando L-[3 H]Glu. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes pases. Los parámetros cinéticos calculados, B_{\max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

A continuación se expone una tabla resumen de los resultados obtenidos.

	Control	Adenosina 1 μ M 2h	Adenosina 1 μ M 6h	Adenosina 1 μ M 24h
B_{\max} (pmol/mg)	133,75 \pm 9,54	288,47 \pm 30,22 ***	279,73 \pm 31,72 **	276,11 \pm 55,50 *
K_D (nM)	707,59 \pm 44,45	2344,71 \pm 368,49 **	2231,58 \pm 459,50 *	2126,69 \pm 398,12 **

Tabla 24: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en células C6 expuestas a hipoxia moderada. En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente respecto al correspondiente control.

Estos resultados sugieren que en células C6 ocurren procesos de trans-modulación entre los receptores de adenosina, principales responsables de mediar las respuestas celulares como consecuencia de la exposición a este neuromodulador, y los receptores metabotrópicos de glutamato.

Por otro lado, la comparación entre los datos obtenidos en los ensayos de unión de radioligando en los experimentos de hipoxia moderada y los obtenidos en los tratamientos con adenosina revela que no hay diferencias significativas entre ellos, indicando que los cambios observados como consecuencia de la

exposición celular a una presión parcial de oxígeno menor eran causados por un aumento de la cantidad de adenosina en el medio extracelular. Una gráfica resumen de la comparación de estos valores se expone en la Figura 68. En el panel A se expone una comparación en los valores obtenidos para el número total de receptores, en el panel B, para la afinidad de los mismos.

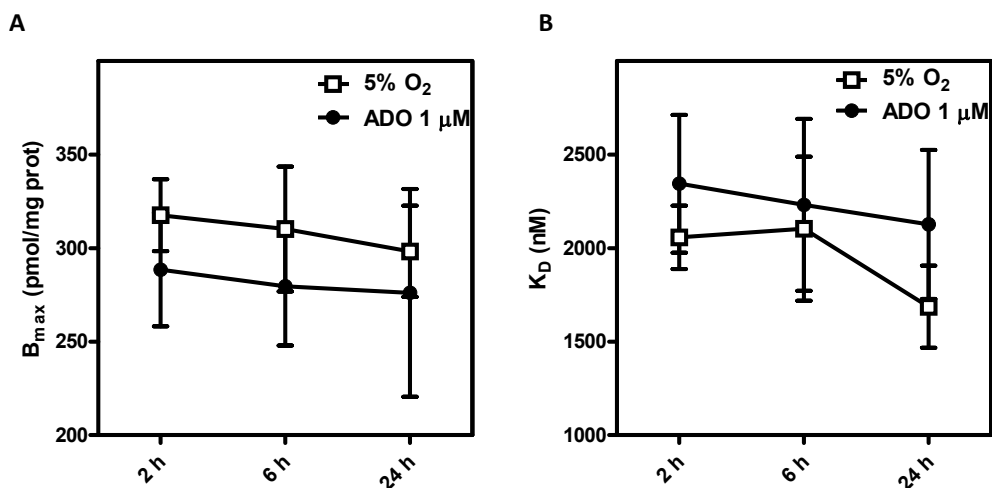


Figura 68: Comparativa entre los parámetros cinéticos obtenidos en los experimentos de unión de radioligando al someter las células C6 a 5% O₂ o bien a adenosina 1 μM. Los datos expuestos provienen de las Tablas 23 y 24. Comparativa de los valores de B_{max} (panel A) y de los valores de K_D (panel B).

c) Receptores de adenosina.

Como se ha expuesto en *Métodos*, la cuantificación de los receptores de adenosina se realizó mediante la técnica de unión de radioligando, tal y como se ha expuesto anteriormente.

Se determinó para los receptores A₁ de adenosina que la hipoxia moderada, durante 2, 6 y 24 horas, producía a su vez una disminución de la densidad de receptores de este tipo en la superficie celular (Figura 69, panel A). Dicha disminución, se correspondía con la pérdida de un 60% de los receptores A₁ (panel B) e iba asociada con un aumento en la afinidad de los mismos (panel C). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas al analizar el efecto de la hipoxia moderada sobre los receptores A₁ entre los distintos tiempos ensayados.

Una vez observado el efecto de la hipoxia a nivel de la superficie celular se procedió a analizar la funcionalidad de los receptores. Como se ha descrito en la *Introducción*, la principal vía de transducción de señales mediada por el receptor A₁ es la inhibición de la enzima adenilato ciclasa a través de una proteína G_{i/o}, por este motivo se estudió el efecto de la hipoxia moderada sobre la capacidad de transducción del receptor A₁. Como se observa en la Figura 70, panel A, la hipoxia producía una disminución del nivel basal de AMPc similar en todos los tiempos de estudio (Control: 1,12 ± 0,11; 5% O₂: 2h: 0,5 ± 0,08, p<0,001; 6h: 0,47 ± 0,09, p<0,001; 24h: 0,55 ± 0,2 pmol/mg prot min, p<0,01). Por otro lado, el empleo de forskolina para estimular directamente la enzima no mostraba diferencias significativas entre la situación control y la hipoxia moderada.

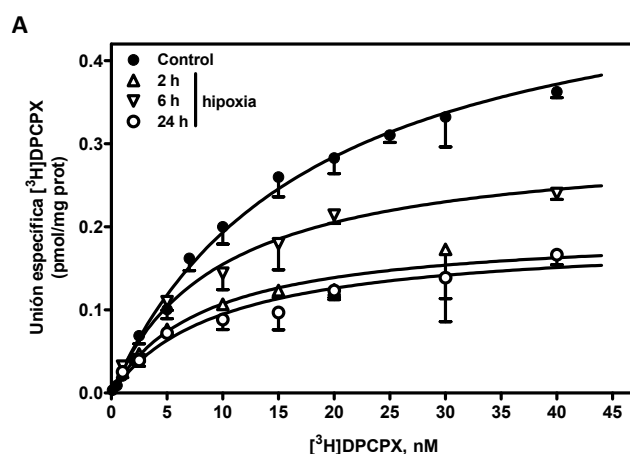


Figura 69: La exposición a hipoxia moderada modula los receptores A_1 en la superficie celular. Células C6 se expusieron a 5% O_2 durante 2, 6 o 24 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando $[^3H]$ DPCPX. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos (panel A). Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel B) y K_D (panel C), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el software GraphPad Prism 5.0. *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

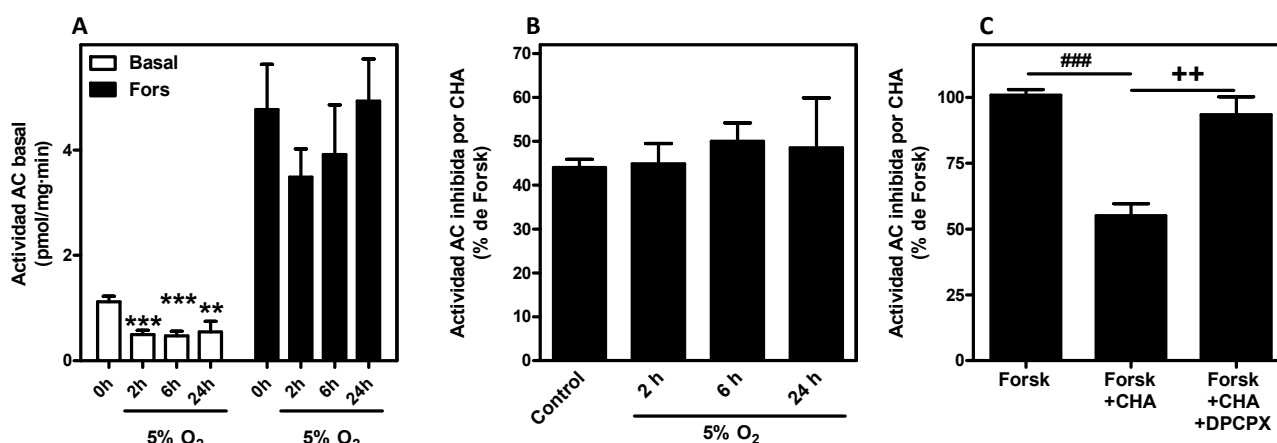
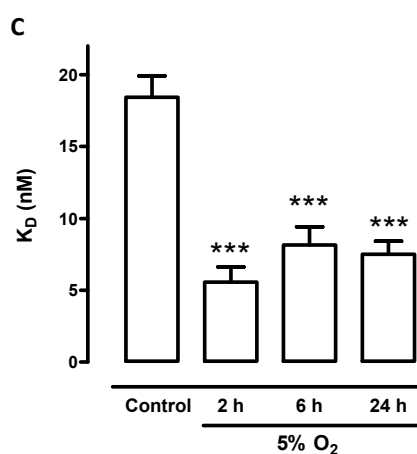
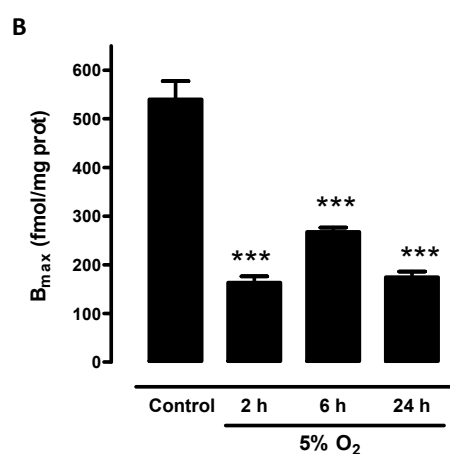


Figura 70: Efecto de la hipoxia moderada sobre la actividad AC basal y su inhibición mediada por el receptor A_1 . La acumulación basal de AMPc así como la estimulada por forskolina 5 μM (Fors) fue estudiada en células C6 expuestas a hipoxia moderada durante 2, 6 y 24 horas y células C6 controles (panel A). Se estudió también el efecto de la hipoxia moderada sobre la inhibición de la actividad AC por el receptor A_1 (panel B), empleando el agonista específico CHA a 1 mM para inhibir la actividad estimulada por forskolina 5 μM . Por último, se comprobó que el efecto observado se producía a través del receptor A_1 , para ello se empleó DPCPX 100 μM , antagonista específico del receptor A_1 , durante los 5 minutos previos y se mantuvo durante el ensayo de acumulación (panel C). Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos pases. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente del valor en normoxia; ++ $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$, valor entre grupos significativamente diferente.

En lo que respecta a la capacidad del receptor A_1 para inhibir esta vía de transducción, como se observa en el panel B de la misma figura, no se veía alterada por el efecto de la hipoxia moderada (Control: $44 \pm 1,9$; 5% O_2 : 2h: $45 \pm 4,6$; 6h: $50 \pm 4,2$; 24h: $48,5 \pm 11,4\%$), a pesar de la disminución en el número de receptores observada. Por otro lado, se comprobó (panel C) que el efecto inhibitor del ligando CHA sobre la actividad AC era mediado por el receptor A_1 , ya que el empleo del antagonista específico para A_1 DPCPX bloqueaba dicho efecto.

En la *Introducción* se apuntó que otra vía secundaria de transducción de señales mediada por el receptor A_1 era la activación de la fosfolipasa C con el consiguiente aumento del calcio intracelular. Dado que a pesar de la disminución tan notable de receptores A_1 por causa de la hipoxia no se observaban alteraciones en el sistema de transducción receptor A_1 – proteína $G_{i/o}$ – AC, comprobamos la capacidad de transducción a través del sistema PLC en condiciones normóxicas. Para ello se empleó Fluo4, una sonda sensible al calcio libre intracelular. Como se observa en la Figura 71, panel A, en condiciones normóxicas sólo cuando se añadía (S)-DHPG, agonista específico del subgrupo I de los receptores metabotrópicos de glutamato, acoplados principalmente al sistema PLC, se observaba un aumento del calcio intracelular, mientras que el agonista específico del receptor A_1 , CHA, no era capaz de estimular el sistema PLC a las distintas concentraciones ensayadas. Por otro lado, en el panel B de la misma Figura, se muestra la batería de concentraciones ensayadas de los agonistas específicos del receptor A_1 , CHA y CPA, y también el control positivo del (S)-DHPG, que asegura la validez del ensayo. Estos resultados sugieren que la vía de transducción principal de los receptores A_1 en células C6 es la inhibición de la adenilato ciclasa y no el aumento de calcio intracelular a través de PLC.

Con el fin de comprobar el efecto de la hipoxia moderada sobre los receptores A_{2A} se usó la técnica de unión de radioligandos, empleando en este caso [3H]ZM241385 como ligando marcado y teofilina fría para medir la unión inespecífica. Como se muestra en la Figura 72, panel A, la hipoxia moderada produce un aumento de los receptores A_{2A} en la superficie celular. Como se observa en el panel B, el aumento descrito es, al igual que en el caso de los receptores A_1 , independiente del tiempo de tratamiento y empieza a observarse a tiempos tan cortos como 2 horas. Dicho aumento se corresponde aproximadamente con un incremento del 60% del número total de receptores en la superficie celular (Control: $399,0 \pm 16,6$; 5% O_2 : 2h: $655,0 \pm 45,5$; 6h: $657,0 \pm 29,9$, $p < 0,001$; 24h: $679,0 \pm 42,4$ fmol/mg prot, $p < 0,001$).

Sin embargo, en esta ocasión el aumento del número de receptores no se corresponde en todos los casos con una variación de la afinidad de los mismos, como se expone en el panel C de la misma Figura. Tras 2 horas de hipoxia moderada se observaron variaciones significativas en el número total de receptores pero no en la afinidad de los mismos. Sin embargo, a tiempos más prolongados de tratamiento sí se observaban cambios en la afinidad. En este caso el aumento en el número total de receptores venía acompañado por una disminución en la afinidad de los mismos por su ligando ($p < 0,05$ en ambos casos).

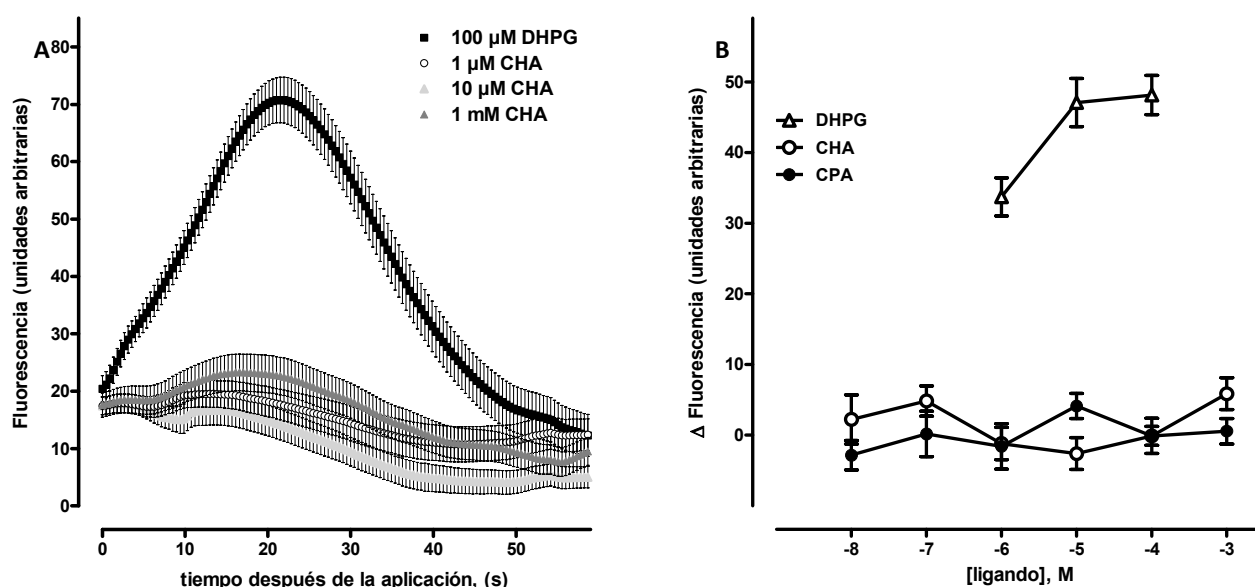


Figura 71: Movilización del calcio en células C6. Células C6 mantenidas en condiciones normóxicas se incubaron con diferentes concentraciones de DHPG, agonista del grupo I de los receptores mGlu, CPA y CHA, agonistas del receptor A₁. Panel A. Cambios en la fluorescencia medidos en el tiempo desde el momento de aplicación del ligando. Los resultados son la media \pm SEM del seguimiento de 40 células. Panel B. Respuesta de la movilización de calcio medida como el incremento máximo de la señal fluorescente con el tiempo. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos en los que se emplearon distintos pases.

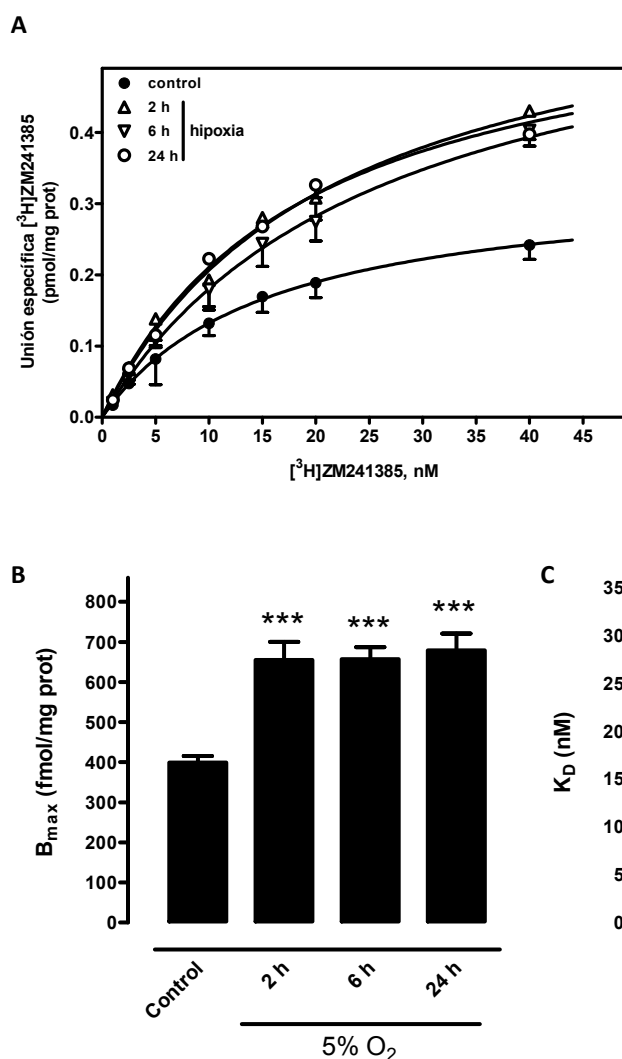
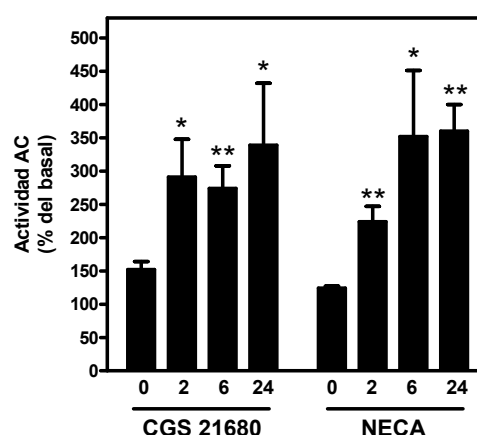


Figura 72: La exposición a hipoxia moderada modula los receptores A_{2A} en la superficie celular. Células C6 se expusieron o no a 5% O₂ durante 2, 6 o 24 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [³H]ZM241385. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes pases (panel A). Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel B) y K_D (panel C), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el software GraphPad Prism 5.0. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 significativamente diferente con respecto al control.

También se comprobó la funcionalidad del sistema de transducción mediado por el receptor A_{2A} , esto es, la activación de la enzima adenilato ciclasa a través de una proteína G_s . Para ello, se emplearon los siguientes ligandos: CGS 21680, agonista específico de A_{2A} , cuya selectividad por los sitios A_{2A} ya ha quedado demostrada en apartados anteriores de la presente *Memoria*, y NECA, un agonista general de los receptores A_2 que, empleado a 100 μ M, se demostró con anterioridad que tenía preferencia por los sitios A_{2B} en células C6 (Castillo y col., 2007). Como se muestra en la Figura 73, la hipoxia moderada produce un aumento de la capacidad estimuladora de ambos ligandos sobre la enzima AC con respecto a las condiciones normóxicas. Así, para CGS 21680 el incremento porcentual de la estimulación fue de un $152 \pm 12\%$ en condiciones normóxicas y pasó a los siguientes valores tras la exposición a hipoxia moderada: 2 h, $291 \pm 57\%$, $p < 0,05$; 6 h, $274 \pm 34\%$, $p < 0,01$; 24 h, $339 \pm 93\%$, $p < 0,05$. Por otro lado, los valores obtenidos para la estimulación producida por NECA incrementaron de un $124 \pm 3\%$ a los siguientes valores: 2 h, $224 \pm 23\%$, $p < 0,01$; 6 h, $352 \pm 99\%$, $p < 0,05$; 24 h, $360 \pm 40\%$, $p < 0,01$.

Figura 73: Efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la actividad AC estimulada por los receptores A_2 . Células C6 fueron expuestas o no a 5% O_2 durante 2, 6 o 24 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de AMPc. Se estudió el efecto de la exposición a hipoxia moderada sobre la estimulación de la actividad AC promovida por el receptor A_{2A} , para lo que se empleó el agonista específico CGS 21680 a 1 μ M, así como la capacidad estimuladora de NECA a 100 μ M. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos pases, expresados porcentualmente con respecto a la actividad AC basal. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente de su correspondiente control.



Al igual que en apartados anteriores se empleó adenosina, a una concentración final de 1 μ M, con el fin de comprobar si la regulación de los receptores era debida al aumento de los niveles de adenosina.

En el caso del receptor A_1 , la medida de la densidad de receptores en superficie, así como de su afinidad, proporcionó, tras los tratamientos con adenosina, valores similares de B_{max} y K_D a los obtenidos tras someter a las células a hipoxia moderada durante los mismos tiempos. Como se muestra en la Figura 74, panel A, el tratamiento con adenosina produce una disminución del número de receptores A_1 en la superficie celular, tanto a 2, 6 y 24 horas de tratamiento. En el panel B se representan los datos obtenidos para la B_{max} de los receptores A_1 tras los tratamientos con adenosina (Control: $539,9 \pm 37,8$; adenosina: 2 h: $272,0 \pm 49,4$, $p < 0,001$; 6 h: $225,0 \pm 40,1$, $p < 0,001$; 24 h: $191,0 \pm 4,3$ fmol/mg prot, $p < 0,001$). Por su parte, el análisis de los datos de la afinidad refleja que existe un aumento significativo de la afinidad de los receptores A_1 (Control: $18,4 \pm 1,5$ nM; adenosina: 2h: $9,7 \pm 1,6$ nM, $p < 0,01$; 6h: $7,9 \pm 1,8$ nM, $p < 0,01$; 24h: $5,7 \pm 0,4$ nM, $p < 0,001$), siendo esta variación, al igual que la observada en la B_{max} , independiente del tiempo de tratamiento.

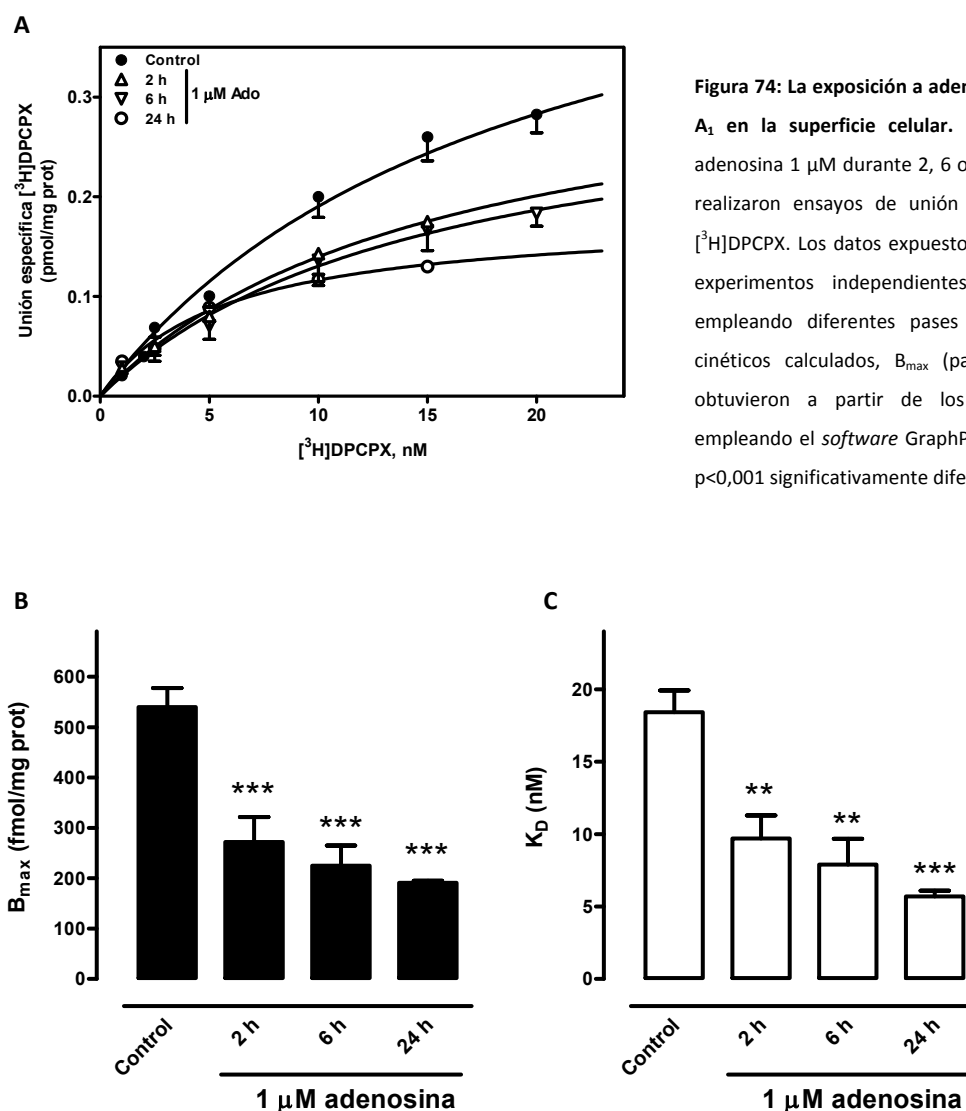


Figura 74: La exposición a adenosina modula los receptores A_1 en la superficie celular. Células C6 se expusieron a adenosina 1 μ M durante 2, 6 o 24 horas. Posteriormente se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [3 H]DPCPX. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes pases (panel A). Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel B) y K_D (panel C), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

Aunque no estaba descrita la regulación al alza de los receptores A_{2A} como consecuencia de un tratamiento con agonista, a la luz de los datos obtenidos para el receptor A_1 en C6 se decidió investigar qué efecto tenía el tratamiento con adenosina en estos receptores. Así, como muestra la Figura 75, panel A, el tratamiento con adenosina producía, al igual que la exposición a hipoxia moderada, un incremento del número total de receptores en la superficie celular a todos los tiempos ensayados. Los datos que se desprenden del análisis estadístico de los valores de B_{max} obtenidos, panel B, (Control: $399,0 \pm 16,6$; adenosina: 2h: $589,0 \pm 66,0$, $p < 0,05$; 6h: $618,0 \pm 46,3$, $p < 0,01$; 24h: $760,0 \pm 39,9$ fmol/mg prot, $p < 0,001$) indican que además este aumento es similar al observado tras las exposiciones a hipoxia moderada e independiente del tiempo de exposición a adenosina. Sin embargo, en el caso de la afinidad del receptor A_{2A} por su ligando, panel C, no se observó ningún efecto significativo (Control: $18,0 \pm 3,0$; adenosina: 2h: $17,4 \pm 1,6$, $p > 0,05$; 6h: $14,4 \pm 2,7$, $p > 0,05$; 24h: $16,8 \pm 0,7$ nM, $p > 0,05$)

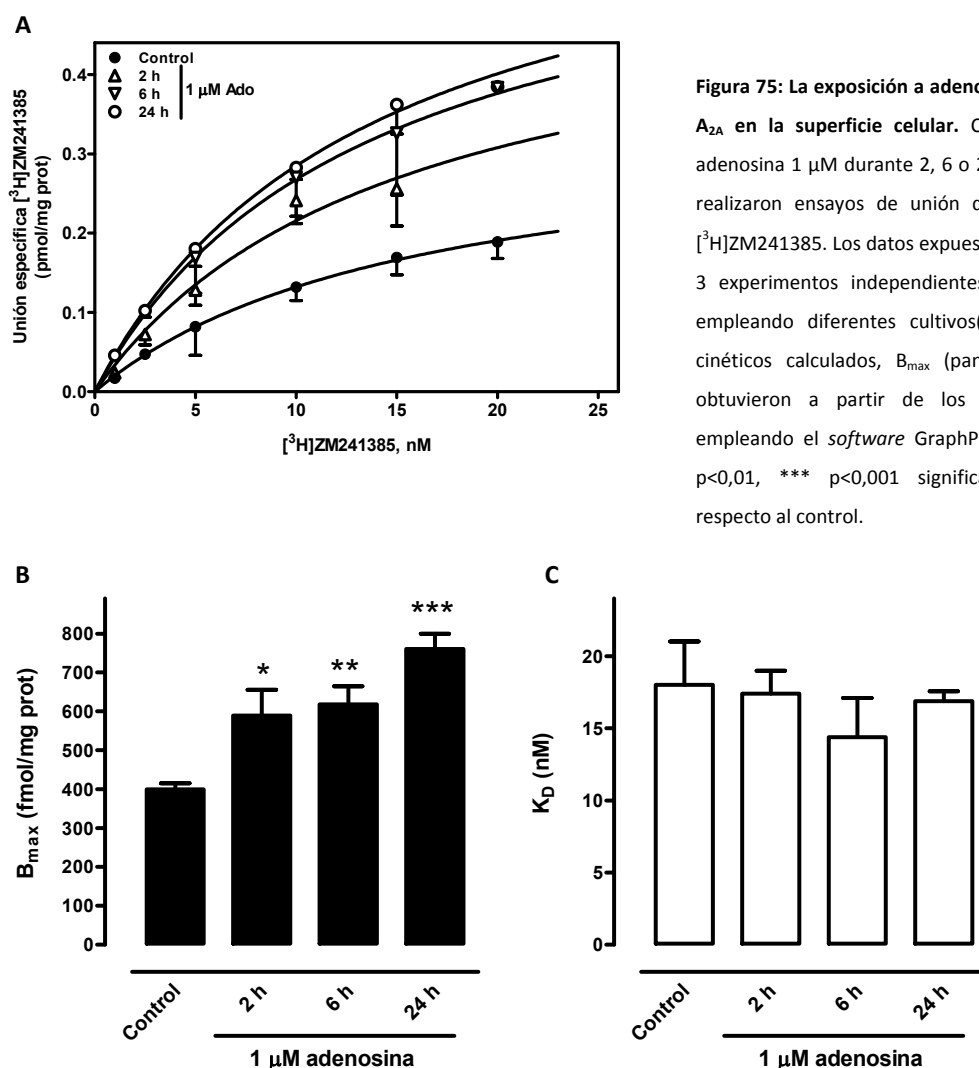


Figura 75: La exposición a adenosina modula los receptores A_{2A} en la superficie celular. Células C6 se expusieron a adenosina 1 μ M durante 2, 6 o 24 horas. Posteriormente se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [³H]ZM241385. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos (panel A). Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel B) y K_D (panel C), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el software GraphPad Prism 5.0. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 significativamente diferente con respecto al control.

Estos resultados sugerían que el incremento de adenosina en el medio extracelular es el responsable de la modulación en sentido inverso de los receptores A₁ y A_{2A} de adenosina. Con el fin de confirmar esta hipótesis, se empleó la enzima adenosina desaminasa (EC 3.5.4.4, ADA), enzima de la vía de la recuperación de las purinas que cataliza la desaminación irreversible de la adenosina para formar inosina y que eliminaría, por tanto, la adenosina del medio de cultivo. Se realizaron ensayos puntuales de unión de radioligando en los que se estudió si la adición de ADA (2 U/mL) durante los periodos de hipoxia moderada era suficiente o no para revertir el efecto de la hipoxia sobre la densidad de los receptores.

Dado que el efecto de la hipoxia sobre la densidad de receptores no era dependiente del tiempo, estos experimentos sólo fueron llevados a cabo a dos horas de exposición. Como se muestra en el panel A de la mencionada figura, en el caso de los receptores A₁, la exposición a la enzima mientras se mantenían a las células en hipoxia devolvía los niveles de receptores A₁ a valores similares a los obtenidos en la situación control, observándose, además, que en condiciones normóxicas la incubación con ADA no producía efecto alguno sobre la cantidad de receptores A₁ en la superficie celular (Normoxia: 0,34 \pm 0,02; Normoxia + ADA: 0,33 \pm 0,03; Hipoxia: 0,15 \pm 0,02; Hipoxia + ADA: 0,38 \pm 0,03 fmol/mg prot).

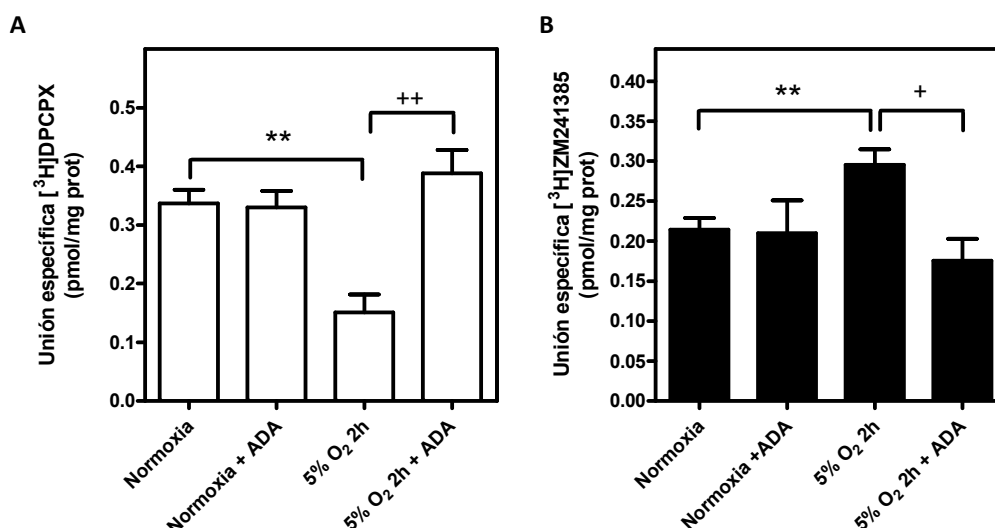


Figura 76: Efecto de la adenosina desaminasa durante la hipoxia. Células C6 se mantuvieron en condiciones normóxicas o hipóxicas durante 2 horas en presencia o ausencia de 2 U/mL de ADA. Posteriormente se realizaron ensayos puntuales de unión de radioligando, siguiendo el procedimiento descrito en *Métodos*, empleando [³H]DPCPX a 20 nM, para medir la modulación de los receptores A₁ (panel A), y [³H]ZM241385 a 20 nM, para medir la modulación de los receptores A_{2A} (panel B). Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos en los que se emplearon disintos pases. ** $p < 0,01$ significativamente diferente del valor observado en normoxia; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ significativamente diferente del valor observado en hipoxia moderada sin ADA.

El estudio de los receptores A_{2A} en las mismas condiciones arrojó resultados similares a los obtenidos para el receptor A₁, como se expone en el panel B de la misma Figura. De nuevo, el tratamiento con ADA durante la hipoxia devolvía los niveles del receptor A_{2A} a los observados durante la normoxia, mientras que la enzima ADA por sí sola no ejercía ningún efecto regulador sobre este tipo de receptores en la situación control (Normoxia: $0,21 \pm 0,01$; Normoxia + ADA: $0,21 \pm 0,04$; Hipoxia: $0,30 \pm 0,02$; Hipoxia + ADA: $0,17 \pm 0,03$ fmol/mg prot).

Con el fin de ahondar aún más en el mecanismo responsable de la regulación de estos receptores, dado que ha quedado demostrado que la liberación de adenosina durante la hipoxia está implicada en la modulación de los dos subtipos de receptores estudiados y puesto que, además, estos receptores deben ser los principales sensores de dicho nucleósido en el medio, se recurrió al empleo de antagonistas específicos de ambos receptores para verificar si la adenosina ejercía su efecto directo sobre alguno de ellos.

Al igual que en los experimentos descritos con anterioridad, estos ensayos sólo se realizaron con células sometidas a 2 horas de hipoxia moderada, ya que la variación de la densidad de receptores no era significativamente diferente entre éste y los otros tiempos de experimentación. Como se expone en la Figura 77, panel A, la presencia de DPCPX, antagonista específico de los receptores A₁, de ZM241385, antagonista específico de los receptores A_{2A}, o de ambos, no producía ningún efecto sobre el ensayo puntual de unión de unión de [³H]DPCPX tras dos horas de incubación en normoxia. Sin embargo, la presencia de DPCPX cuando se sometían las células a hipoxia, ya fuera sólo (Hipoxia + DPCPX: $0,33 \pm 0,05$ fmol/mg prot) o en presencia de ZM241385 (Hipoxia + DPCPX + ZM241385: $0,32 \pm 0,05$ fmol/mg prot), mantenía los valores para la unión del

radioligando en valores similares a los obtenidos en condiciones de normoxia (Normoxia: $0,34 \pm 0,02$ fmol/mg prot). Por su parte, el ligando ZM241385 no ejercía ningún efecto por sí solo en la modulación de los receptores por la hipoxia moderada.

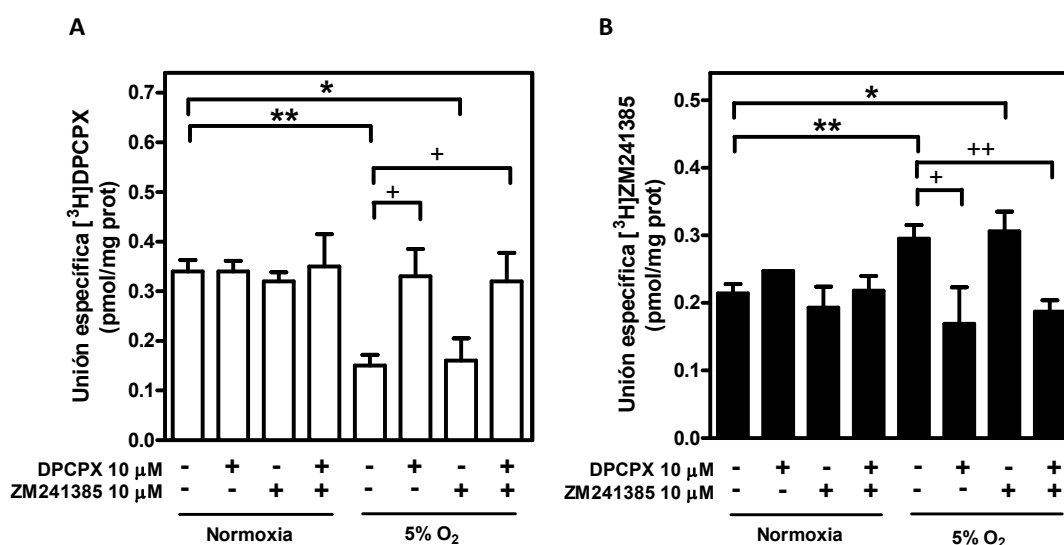


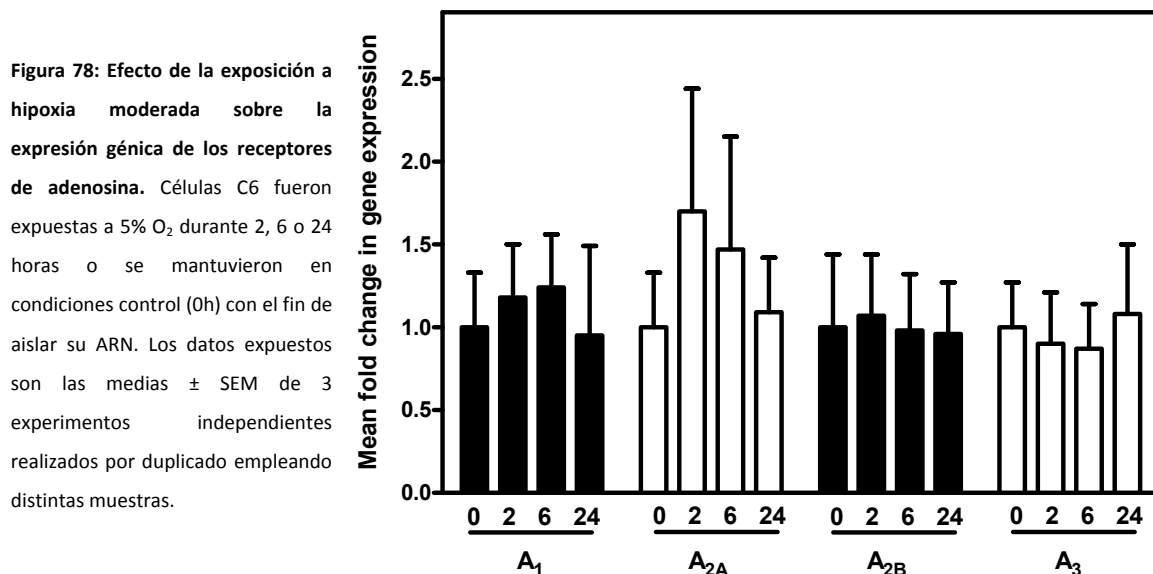
Figura 77: La modulación de los receptores de adenosina durante la hipoxia moderada se produce a través de la activación del receptor A₁. Células C6 se mantuvieron en condiciones normóxicas o hipóxicas durante 2 horas en presencia o ausencia de DPCPX a 10 μM, antagonista específico del receptor A₁, de ZM241385 a 10 μM, antagonista específico del receptor A_{2A}, o de una combinación de ambos ligandos. Posteriormente se realizaron ensayos puntuales de unión de radioligando, siguiendo el procedimiento descrito en *Métodos*, empleando [³H]DPCPX a 20 nM, para medir la modulación de los receptores A₁ (panel A), y [³H]ZM241385 a 20 nM, para medir la modulación de los receptores A_{2A} (panel B). Los datos representan la media ± SEM de tres experimentos en los que se emplearon disintos pases. * p<0,05, ** p<0,01 significativamente diferente del valor observado en normoxia; + p<0,05, ++ p<0,01 significativamente diferente del valor observado en hipoxia moderada.

Por otro lado, cuando se realizaron estos mismos experimentos empleando [³H]ZM241385 como radioligando, los resultados obtenidos fueron similares tras dos horas de tratamiento, como se muestra en el panel B. Por un lado, el empleo de los antagonistas descritos no ejercía ningún efecto sobre el número de receptores A_{2A} en condiciones normóxicas. Sin embargo, la presencia de antagonistas durante la hipoxia indicaba que el bloqueo de los receptores A₁ durante este proceso bloqueaba a su vez el efecto de la hipoxia sobre los receptores A_{2A}, ya fuera sólo (Hipoxia + DPCPX: $0,17 \pm 0,05$; Hipoxia: $0,30 \pm 0,02$ fmol/mg prot; p<0,05) o combinado con ZM24135 (Hipoxia + DPCPX + ZM241385: $0,19 \pm 0,02$ fmol/mg prot), mientras que, de nuevo, el empleo de ZM241385 no inducía sobre las células cambios diferentes a los ya observados durante la hipoxia (Hipoxia + ZM241385: $0,31 \pm 0,03$ fmol/mg prot).

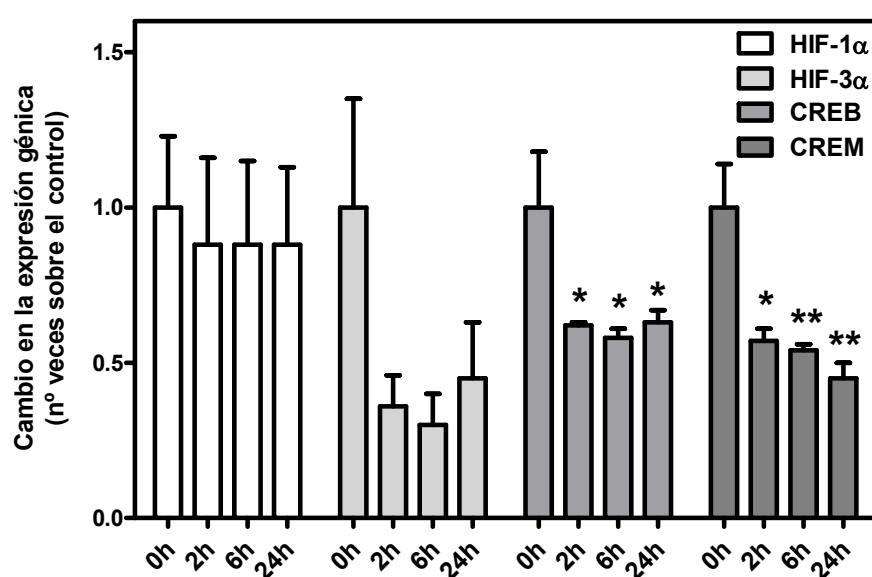
Estos resultados estudiados en conjunto indican que la hipoxia moderada modula los receptores A₁ y A_{2A} de adenosina a través de la activación del receptor A₁.

Por último, se comprobó mediante PCR a tiempo real el efecto que ejercía la hipoxia moderada sobre la expresión génica de los receptores de adenosina, así como en la expresión de algunos factores de transcripción

relacionados con la hipoxia o el AMPc. Como se observa en la Figura 78, la hipoxia moderada no modula la expresión de ninguno de los genes que codifican para los receptores de adenosina.



Por otro lado, en lo que a la expresión génica de factores de transcripción se refiere, los resultados se resumen en la Figura 79. Como se observa en la citada Figura, no existen variaciones significativas en HIF-1 α , el principal modulador de los efectos de la bajada de oxígeno, lo que concuerda con lo observado por *Western blot* (datos no mostrados), mientras que para HIF-3 α , un regulador negativo de HIF-1 α , lo que se observa es una disminución aparente, aunque no significativa, de su expresión génica. En lo que a los factores relacionados con el AMPc se refiere, los factores de transcripción constitutivos CREB y CREM, lo que se observa es una disminución significativa de la expresión génica de ambos a todas las horas estudiadas.



La modulación de los receptores A_1 y A_{2A} de adenosina en el modelo de C6 fue publicada con el título “*Modulation of adenosine A_1 and A_{2A} receptors in C6 glioma cells during hypoxia: involvement of endogenous adenosine*” en la revista *Journal of Neurochemistry* (2008) **105**: 2315–2329.

d) Tabla resumen.

A continuación se exponen dos tablas a modo de resumen con las principales variaciones observadas en los experimentos descritos en este apartado. La primera (Tabla 25) recoge las variaciones observadas en los experimentos empleando 5% O_2 , en la segunda (Tabla 26) en los que se empleó adenosina.

	5% O_2 2h	5% O_2 6h	5% O_2 24h		5% O_2 2h	5% O_2 6h	5% O_2 24h
Viabilidad	≈	≈	≈	ARNm A_1	≈	≈	≈
B_{max} unión L-[3H]Glu	↑	↑	↑	ARNm A_{2A}	≈	≈	≈
K_D unión L-[3H]Glu	↑	↑	↑	ARNm A_{2B}	≈	≈	≈
ARNm mGlu $_1$	≈	≈	↑	ARNm A_3	≈	≈	≈
ARNm PLC β_1	≈	≈	≈	Actividad AC basal	↓	↓	↓
Actividad PLC basal	≈	≈	≈	Actividad A_1 /AC	≈	≈	≈
Actividad PLC grupo I	≈	≈	≈	Actividad A_{2A} /AC	↑	↑	↑
B_{max} unión [3H]DPCPX	↓	↓	↓	ARNm HIF-1 α	≈	≈	≈
K_D unión L-[3H]DPCPX	↓	↓	↓	ARNm HIF-3 α	≈	≈	≈
B_{max} unión [3H]ZM241385	↑	↑	↑	ARNm CREB	↓	↓	↓
K_D unión [3H]ZM241385	≈	↑	↑	ARNm CREM	↓	↓	↓

Tabla 25: Resumen de los resultados obtenidos en células C6 expuestas a hipoxia moderada. En esta tabla se exponen gráficamente los resultados numéricos descritos en este capítulo. ≈, no hay variación estadística, ↑, se observa un aumento con respecto a la situación control, ↓, se observa una disminución con respecto a la situación control.

	ADO 1 μ M 2h	ADO 1 μ M 6h	ADO 1 μ M 24h
B_{\max} unión L-[3 H]Glu	↑	↑	↑
K_D unión L-[3 H]Glu	↑	↑	↑
B_{\max} unión [3 H]DPCPX	↓	↓	↓
K_D unión [3 H]DPCPX	↓	↓	↓
B_{\max} unión [3 H]ZM241385	↑	↑	↑
K_D unión [3 H] ZM241385	≈	≈	≈

Tabla 26: Resumen de los resultados obtenidos en células C6 expuestas a hipoxia moderada. En esta tabla se exponen gráficamente los resultados numéricos descritos en este capítulo. ≈, no hay variación estadística, ↑, se observa un aumento con respecto a la situación control, ↓, se observa una disminución con respecto a la situación control.

IV.4 Muerte celular inducida por el péptido amiloide.

IV.4.1 En cultivos primarios de neuronas de corteza.

En 2005 fue publicado por este grupo de investigación, en colaboración con el grupo del Dr. Isidre Ferrer, un trabajo en el que se relacionaba la cantidad total de receptores metabotrópicos de glutamato en membrana plasmática de homogenados de corteza frontal de cerebro humano con la progresión de la enfermedad de Alzheimer, en concreto se observaba que según avanzaba la enfermedad menor era la cantidad de receptores metabotrópicos de glutamato detectada (Albasanz y col., 2005). El objetivo de los trabajos expuestos en el siguiente apartado fue confirmar estos resultados empleando un cultivo primario de neuronas de corteza de cerebro de rata, con el fin de estudiar, en la medida en la que fuera posible, cuántos cambios de los descritos eran atribuibles a las neuronas corticales, al menos *in vitro*.

a) Viabilidad.

El primer paso consistió en describir el modelo de toxicidad *in vitro* a emplear. En todos estos experimentos no se empleó el péptido β amiloide completo, cuyas acumulaciones son características en la enfermedad de Alzheimer, sino que se empleó sólo la fracción del péptido que contenía el efecto tóxico del péptido completo (Yankner y col., 1990). Ésta comprendía los aminoácidos que van del 25 al 35 (βA_{25-35}) de los cuarenta y dos que constituyen el péptido β amiloide encontrado en dichas acumulaciones.

Se comprobó con un gradiente de concentraciones la toxicidad que ejercía la exposición a βA_{25-35} en cultivo tras 24 horas de incubación. Para ello se recurrió al test de viabilidad basado en la colorimetría del MTT y los resultados obtenidos para estas condiciones se exponen en el panel A de la Figura 80. Como se muestra, la

exposición a βA_{25-35} producía una disminución de la viabilidad dependiente de la concentración, aunque sólo el empleo de las dos concentraciones más altas proporcionaba resultados estadísticamente significativos. Así, cuando se empleaba la concentración de 25 μM la disminución en la viabilidad era de un 32%, mientras que para la concentración de 50 μM la viabilidad disminuía un 35% (Control: $100,00 \pm 6,85$; βA_{25-35} 1 μM : $89,27 \pm 4,99$; 10 μM : $78,37 \pm 6,97$; 25 μM : $67,80 \pm 3,20$, $p < 0,01$; 50 μM : $65,15 \pm 4,02$, $p < 0,01$).

A partir de estos resultados se decidió que la concentración óptima para observar un efecto tóxico como consecuencia de la exposición de neuronas corticales a βA_{25-35} *in vitro* era la de 25 μM . Dado que el trabajo de investigación antes comentado observaba diferencias entre los grados de avance de la enfermedad de Alzheimer y el nivel de receptores metabotrópicos en la superficie celular, se intentó emular el progreso de la enfermedad *in vitro* mediante exposición prolongada al fragmento tóxico. Se establecieron por tanto dos tiempos de incubación sobre los que se realizarían los experimentos posteriores: un tiempo de exposición medio, 24 horas, y un tiempo de exposición prolongado, 48 horas.

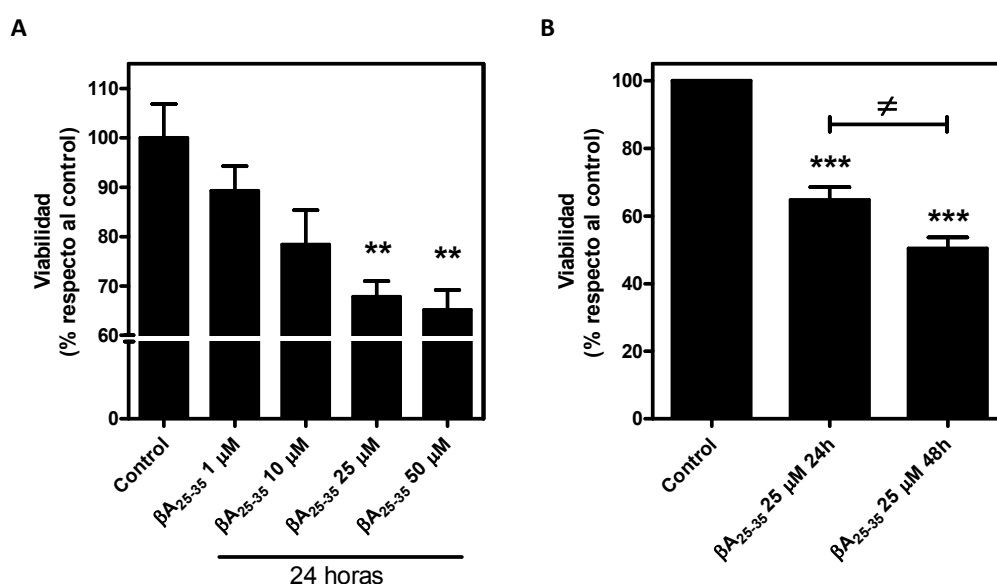
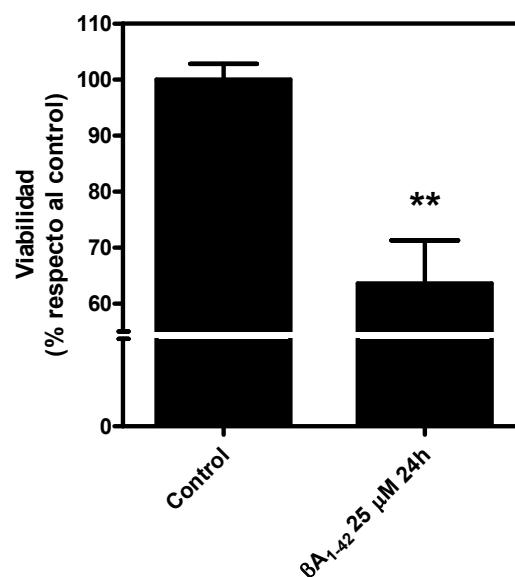


Figura 80: La exposición a βA_{25-35} disminuye la viabilidad celular de forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Neuronas corticales se expusieron a distintas concentraciones de βA_{25-35} durante 24 horas (panel A) y a βA_{25-35} 25 μM durante 24 y 48 horas (panel B). Transcurrido este tiempo se midió la viabilidad celular mediante el test basado en MTT. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, expresados porcentualmente con respecto a la viabilidad de las células controles. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control; \neq $p < 0,05$ diferencias significativas entre grupos.

Los experimentos de viabilidad realizados empleando estos dos tiempos de exposición y la concentración final de 25 μM para el fragmento tóxico se exponen en el panel B de la Figura 80. Como se observa en la citada Figura existen diferencias significativas en la viabilidad observada cuando se prolongaba el tiempo de exposición a βA_{25-35} de 24 (% viabilidad: βA_{25-35} 25 μM 24h: $64,75 \pm 3,83$, $p < 0,001$) a 48 horas (βA_{25-35} 25 μM 48h: $50,39 \pm 3,23$, $p < 0,001$), siendo además estos valores significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

El último paso para corroborar la validez del modelo de toxicidad descrito fue emplear el péptido amiloide completo a la misma concentración a la que se empleó el fragmento 25-35 en los experimentos anteriores y al mismo tiempo en ensayos de viabilidad sobre neuronas corticales. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 81. Como se observa, la incubación de neuronas corticales con βA_{25-35} produce una disminución significativa en la viabilidad de las mismas de un 32% (% viabilidad: Control: $100,00 \pm 2,81$; βA_{1-42} 25 μM 24h: $63,58 \pm 7,70\%$, $p < 0,001$).

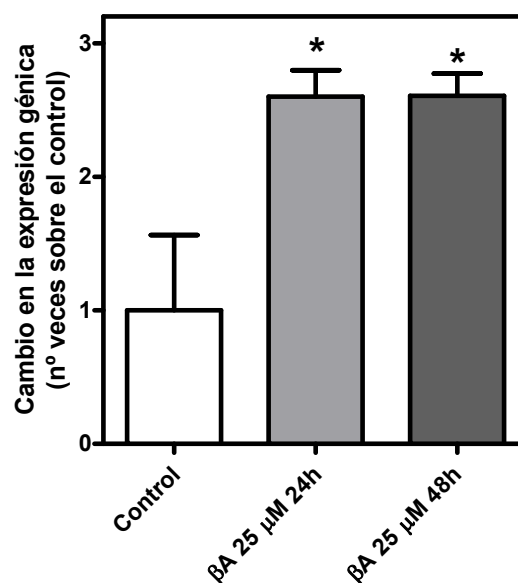
Figura 81: La exposición a βA_{1-42} disminuye la viabilidad celular de forma similar a la exposición a βA_{25-35} . Neuronas corticales se expusieron a βA_{1-42} 25 μM durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se midió la viabilidad celular mediante el test basado en MTT. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, expresados porcentualmente con respecto a la viabilidad de las células controles. ** $p < 0,01$ significativamente diferente con respecto al control.



Este último resultado es prácticamente idéntico al obtenido cuando se empleó el fragmento 25-35, lo que corrobora la hipótesis de que la toxicidad del péptido amiloide se encuentra en esos 10 aminoácidos.

De forma adicional se comprobó si este efecto tóxico detectado ocurría como consecuencia de la activación de la ruta de las caspasas. Se estudió el efecto que ejercía la exposición a βA_{25-35} sobre la caspasa 3, proteína en cuya activación convergen las vías de muerte celular apoptótica. Para ello se realizaron dos tipos de estudios, el primero de ellos a nivel de la expresión génica y el segundo a nivel de la actividad proteolítica de la propia enzima.

Figura 82: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión de caspasa 3. Neuronas corticales fueron expuestas a βA_{25-35} 25 μM durante 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando una sonda específica para el gen codificante para la caspasa 3. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$ significativamente diferente con respecto al control.



Los resultados obtenidos para los ensayos de RT-PCR a tiempo real empleando sondas específicas para el gen que codifica para la caspasa 3, se exponen en la Figura 82. Como se observa, la exposición de neuronas corticales a βA_{25-35} *in vitro* induce un aumento en la expresión génica de la caspasa 3, aumento que se corresponde con incrementos del 160% tras 24 horas y del 161% tras 48 horas de exposición al fragmento tóxico. Ambos resultados fueron significativos estadísticamente cuando se compararon con la situación basal ($p < 0,05$ para ambos) pero no cuando se comparan entre sí.

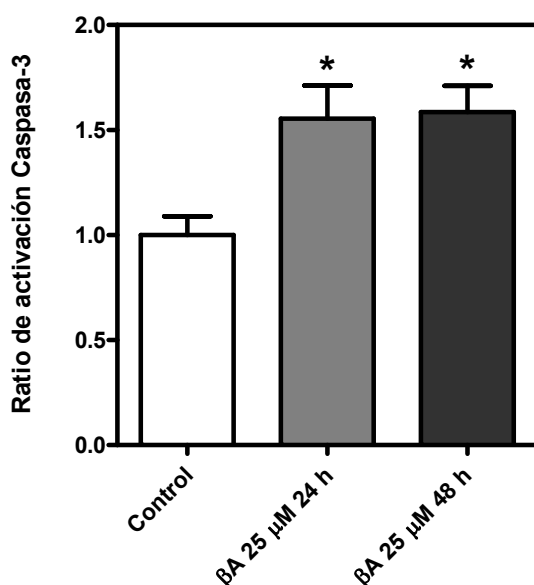


Figura 83: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la actividad de caspasa 3. Neuronas corticales fueron expuestas a βA_{25-35} 25 μM durante 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control. Posteriormente se realizaron ensayos de actividad enzimática específicos de caspasa 3 empleando el kit comercial descrito en *Métodos*. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos pares. * $p < 0,05$ significativamente diferente con respecto a la actividad basal.

Por otro lado, la activación de la capacidad proteolítica de caspasa 3 como consecuencia de la exposición a βA_{25-35} se expone en la Figura 83. Para este estudio, se empleó un ensayo comercial basado en la emisión de fluorescencia al producirse el corte proteolítico específico de la caspasa 3 sobre un péptido marcado con un fluoróforo, tal y como se describe en *Métodos*. Como se observa, se aprecia un incremento significativo de la actividad proteolítica de la caspasa 3 tanto a 24 como a 48 horas de tratamiento ($p < 0,05$ para ambos), incrementos que se correspondían con un aumento de actividad de un 55 y de un 59%, respectivamente, respecto al control.

Estos experimentos, tomados en conjunto, apuntan a que la exposición a βA_{25-35} de neuronas corticales *in vitro* induce un aumento de la expresión génica así como de la actividad de la caspasa 3, tal y como era de esperar según los antecedentes bibliográficos, lo que valida definitivamente el diseño experimental de toxicidad por βA_{25-35} empleado.

b) Receptores metabotrópicos de Glutamato.

Una vez demostrada la toxicidad *in vitro* que ejercía la exposición a βA_{25-35} sobre las neuronas corticales, se procedió a comprobar el efecto de esta misma exposición sobre los niveles de los receptores metabotrópicos de glutamato en la superficie celular. Para ello, se realizaron ensayos de unión de radioligandos empleando L-[3H]Glu. Los resultados obtenidos en estos ensayos se exponen en la Figura 84.

Como se muestra en la Figura 84, la exposición a βA_{25-35} producía un aumento significativo del número total de receptores metabotrópicos sobre los niveles expresados en situación basal. Estas variaciones descritas se traducen en un incremento del 65% tras 24 horas de exposición y un incremento del 104% tras las 48 horas sobre los valores detectados en condiciones basales. Sin embargo, a pesar de que tras 48 horas de exposición se apreciaba un aumento en el número total de receptores de un 24% con respecto a la cantidad cuantificada a las 24 horas, la comparación estadística de estos resultados determinó que los valores no eran lo suficientemente distintos como para ser considerados estadísticamente diferentes, no obstante, estaban muy cerca de serlo ($p=0,059$).

Por otro lado, la exposición a βA_{25-35} también modulaba la afinidad de estos receptores por su ligando (panel B), en concreto el parámetro K_D disminuía, es decir, la afinidad aumentaba, hasta valores cercanos a la mitad del observado en condiciones basales tanto a 24 como a 48 horas de exposición. Como se expone en la tabla resumen (Tabla 27), esta disminución era significativa desde el punto de vista estadístico.

Estos resultados demuestran que la exposición a βA_{25-35} modula tanto la cantidad de los receptores metabotrópicos como la afinidad de estos por su ligando en la superficie celular de neuronas corticales.

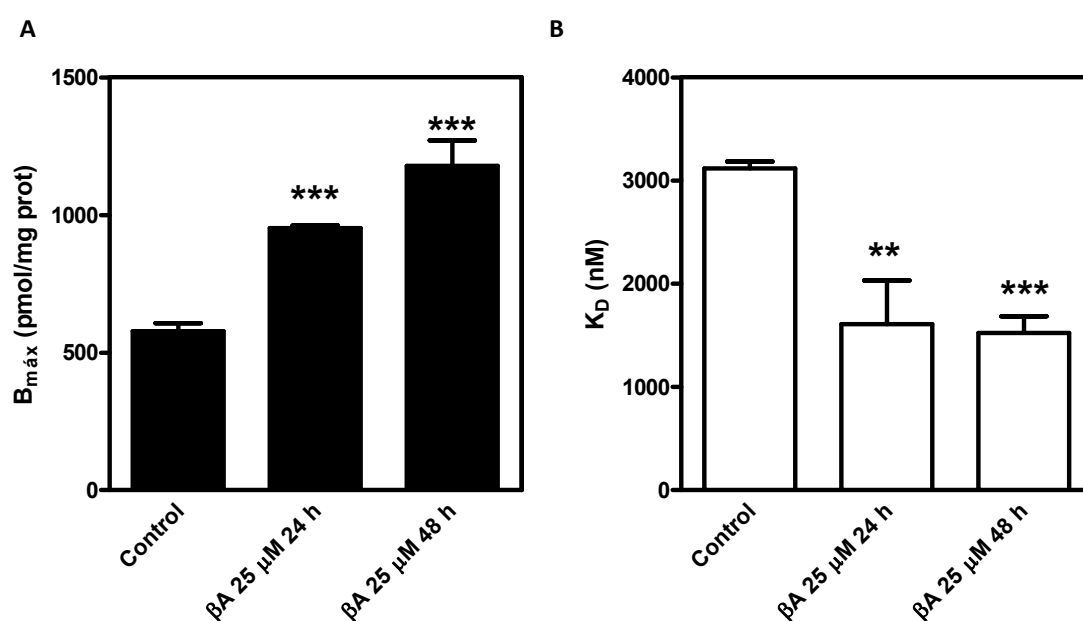


Figura 84: La exposición a βA_{25-35} modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular. Neuronas corticales se expusieron a βA_{25-35} 25 μM durante 24 o 48 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando L-[3H]Glu. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

	Control	βA_{25-35} 25 μM 24 h	βA_{25-35} 25 μM 48 h
$B_{m\acute{a}x}$ (pmol/mg)	577,23 \pm 29,41	952,38 \pm 8,74 ***	1178,22 \pm 92,53 ***
K_D (nM)	3117,97 \pm 68,74	1607,27 \pm 423,00 **	1522,25 \pm 162,64 ***

Tabla 27: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35} . En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente respecto al correspondiente control.

Además se estudió si la exposición a βA_{25-35} inducía cambios en la expresión génica de los genes que codifican para los receptores metabotrópicos del grupo I y la $PLC\beta_1$. Los resultados obtenidos tras estos estudios de PCR a tiempo real se exponen en la Figura 85.

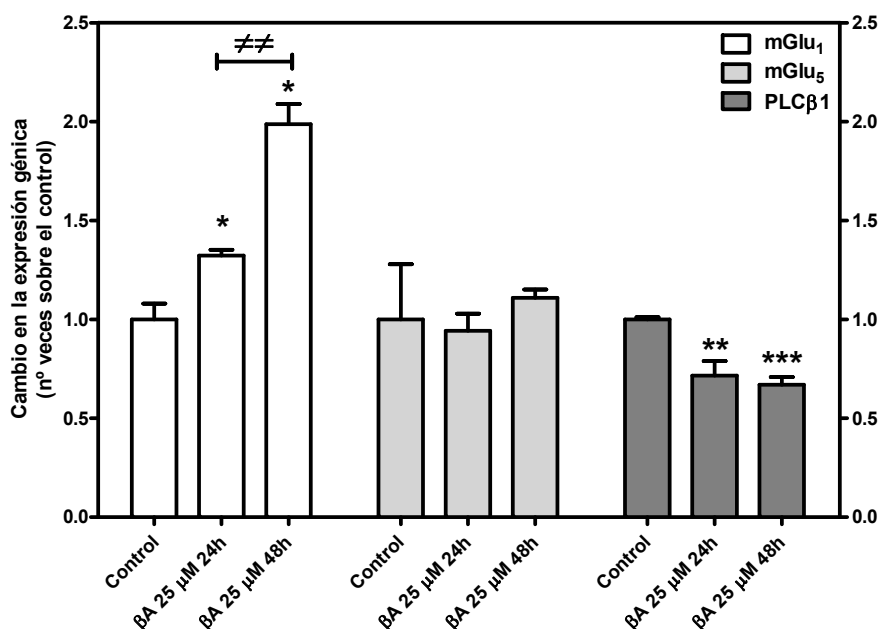


Figura 85: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión génica de mGlu₁, mGlu₅ y PLC β_1 . Neuronas corticales fueron expuestas a βA_{25-35} 25 μM durante 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control; \neq $p < 0,01$ significativamente diferente entre grupos.

Como se observa, la exposición a βA_{25-35} produce cambios diferentes dependiendo de la parte del sistema que estudiemos. Así, para el gen que codifica para el receptor metabotrópico de glutamato mGlu₁ se aprecia un patrón similar al que se describió en el ensayo de unión de radioligando: un incremento significativo de la expresión tras 24 horas de exposición, que se corresponde con un aumento del 32% sobre la expresión basal ($p < 0,05$), y, tras prolongar la exposición hasta alcanzar las 48 horas, este aumento alcanzaba el valor del 99% sobre la expresión basal ($p < 0,05$). La comparación estadística de estos dos grupos de datos revelaba que

entre la expresión detectada para mGlu₁ tras 24 horas y la detectada tras 48 horas de exposición existían diferencias significativas ($p < 0,01$), lo cual no resulta sorprendente puesto que los datos obtenidos a 48 horas suponen un incremento de la expresión de mGlu₁ de un 50% con respecto a los obtenidos tras 24 horas de exposición.

Por otro lado, en el caso del gen codificante para mGlu₅ se aprecia que la exposición a βA_{25-35} no induce cambios en su expresión génica en neuronas corticales, ni a medio ni a largo plazo.

Por último, en lo que se refiere a la expresión de la PLC β_1 , se aprecia una disminución de la misma como consecuencia de la exposición a éste agente tóxico. Así, 24 horas de exposición suponen una disminución significativa de un 28% con respecto a la expresión basal ($p < 0,01$), mientras que a tiempos más prolongados de exposición se detecta una disminución de un 33% ($p < 0,001$) con respecto al basal.

Estos resultados indican que la exposición a βA_{25-35} en neuronas corticales modula, en sentidos opuestos, la expresión génica de mGlu₁ y PLC β_1 . En el caso del receptor mGlu₁, la modulación de su expresión génica sigue el mismo patrón que el descrito en los ensayos de unión de radioligandos, lo que sugiere que el receptor mGlu₁ podría ser uno de los responsables de la modulación en el número total de receptores a nivel de la membrana plasmática descrita con anterioridad.

Con el fin de ahondar más en la regulación sufrida por los receptores metabotrópicos de glutamato como consecuencia de la exposición a βA_{25-35} , se recurrió al empleo de anticuerpos específicos dirigidos contra epítopos extracelulares de los receptores mGlu₁, mGlu₅ y mGlu_{2,3}, y también se estudió el comportamiento de la proteína PLC β_1 , según los procedimientos descritos en *Métodos*. Los resultados obtenidos en estos experimentos tras la exposición de neuronas corticales a βA_{25-35} durante 24 horas, en comparación con la situación control, así como el análisis estadístico de los mismos se exponen en la Figura 86. En el panel A, se exponen micrografías representativas de las imágenes obtenidas en estos experimentos, en el panel B, se muestran los resultados obtenidos al cuantificar la fluorescencia de estas imágenes. A continuación se muestra una tabla resumen con las principales observaciones (Tabla 28).

Como se se puede observar en la Tabla 28, la exposición a βA_{25-35} modula de forma distinta la expresión de las distintas proteínas estudiadas. Así, en el caso de los receptores del grupo I, mGlu₁ y mGlu₅, acoplados principalmente a la hidrólisis de fosfatidilinositoles, se observa un aumento significativo en la densidad de ambos en la superficie celular, lo que contrasta con el marcado descenso observado en la cantidad total de la enzima PLC β_1 . Por otro lado, el caso de los receptores metabotrópicos del grupo II, mGlu_{2,3}, se observa un marcado descenso de la densidad de los mismos en la superficie celular, como consecuencia de la exposición a βA_{25-35} .

En resumen, los experimentos de inmunofluorescencia demuestran que el aumento en la cantidad total de receptores metabotrópicos de glutamato detectado por unión de L-[³H]Glu es debido, al menos en parte, al aumento en el número de receptores mGlu₁ y mGlu₅, y se encuentra contrarrestado por, al menos, la disminución de los receptores que componen el grupo II, mGlu_{2,3}. Por otro lado, la principal enzima a la que están acoplados los receptores metabotrópicos del grupo I, la PLC β_1 , se encuentra disminuida, lo que sugiere

que la señalización mediada por los receptores metabotrópicos del grupo I en estas condiciones podría estar alterada.

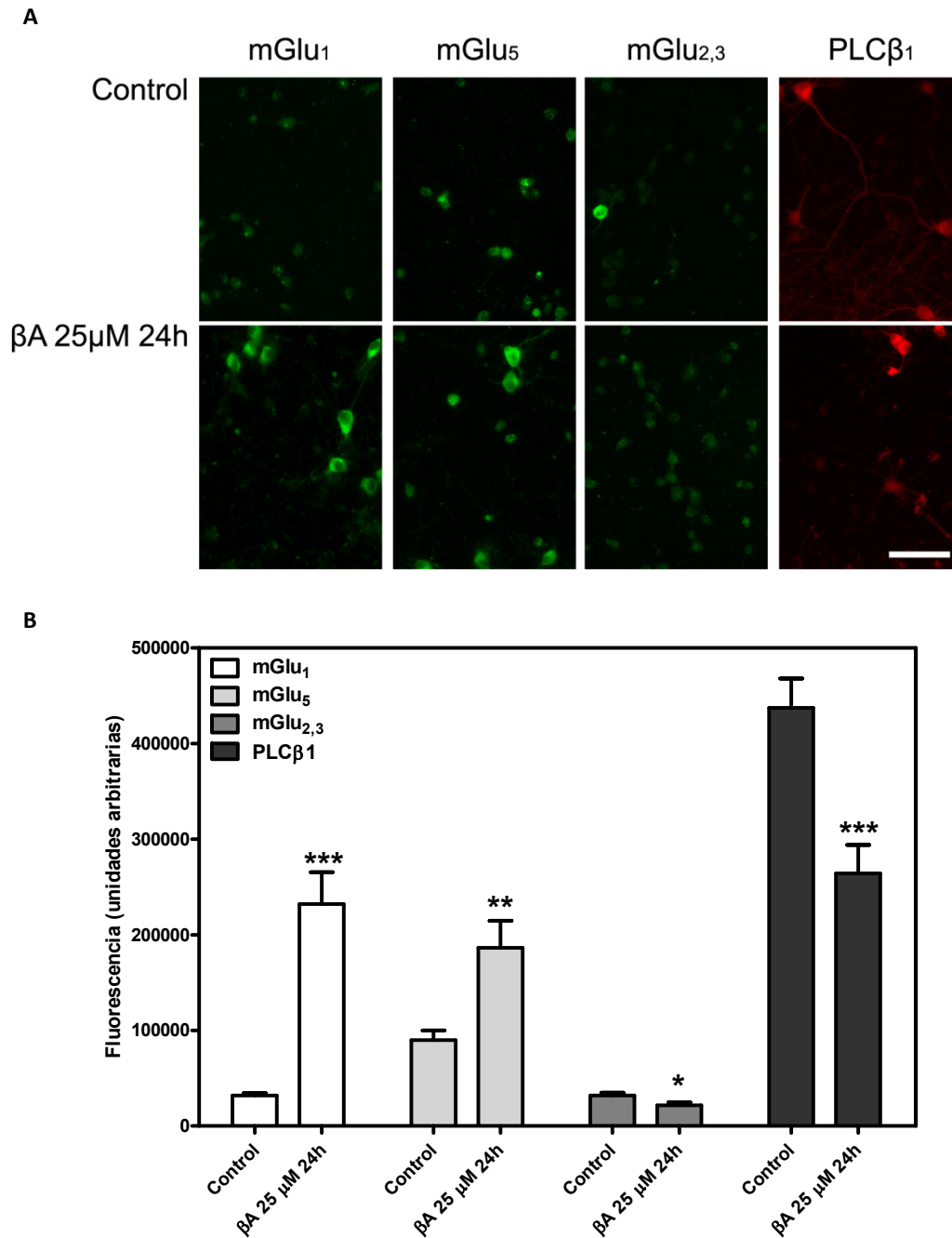


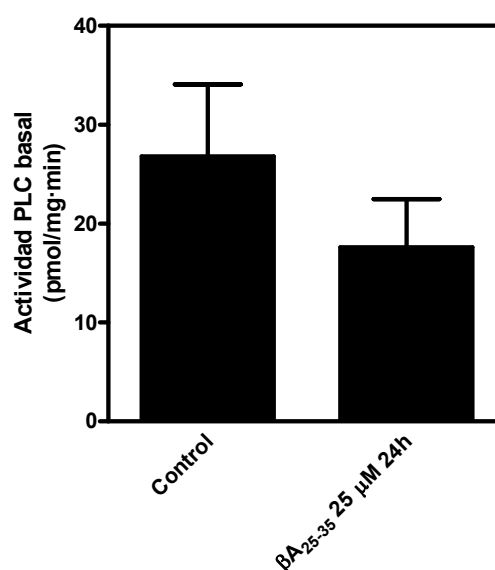
Figura 86: Inmunodetección de mGlu y PLCβ₁ tras la exposición a βA₂₅₋₃₅. Panel A. Micrografías representativas de los resultados obtenidos tras los experimentos de inmunofluorescencia al emplear los anticuerpos para mGlu₁, mGlu₅, mGlu_{2,3} y PLCβ₁ en neuronas corticales controles y expuestas a βA₂₅₋₃₅ 25 μM durante 24 horas. La barra representa 62 μm. Panel B. Diagrama de barras que resume los resultados expuestos en el panel A. Las cuantificaciones se realizaron usando el *software* LAS AF empleando un mínimo de 30 campos por condición experimental. Se exponen las medias ± SEM obtenidas para cada condición experimental. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 significativamente diferente con respecto al control.

	mGlu ₁	mGlu ₅	mGlu _{2,3}	PLC β_1
βA_{25-35} 25 μ M 24h	\uparrow^{***}	\uparrow^{**}	\downarrow^*	\downarrow^{***}

Tabla 28: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de inmunofluorescencia en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35} . Se muestra el sentido de la variación observada con respecto al control mediante flechas: \uparrow aumenta; \downarrow disminuye. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

Dado que el efecto tóxico del péptido amiloide puede ser debido a un aumento excesivo del calcio intracelular, se estudió el acoplamiento de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I y la PLC, realizándose ensayos enzimáticos de actividad en células controles y en células expuestas a βA_{25-35} durante 24 horas. Así, el primer paso fue comprobar el efecto sobre la actividad basal de esta enzima. Los resultados obtenidos en estos experimentos se exponen en la Figura 87. Como se observa, el nivel basal de activación de la enzima PLC está ligeramente disminuida con respecto a la situación control (Control: $26,81 \pm 7,27$; βA_{25-35} : $17,61 \pm 4,85$ pmol/mg•min), aunque de forma no significativa ($p=0,35$).

Figura 87: La exposición a βA_{25-35} no afecta la actividad PLC basal. Neuronas corticales fueron expuestas o no a βA_{25-35} 25 μ M durante 24 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de IP_3 basal. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos.



A continuación se estudió la capacidad del agonista específico del grupo I, (S)-DHPG, para estimular la actividad PLC tanto en neuronas corticales controles como en las sometidas a la exposición a βA_{25-35} , así como de los antagonistas específicos JNJ 16259685, para mGlu₁, y MPEP, para mGlu₅, de inhibir esta estimulación. Los resultados obtenidos en estos experimentos se exponen en la Figura 88.

Como se observa en la mencionada Figura, existen diferencias en la capacidad del ligando (S)-DHPG para estimular el sistema de la PLC en las dos situaciones estudiadas. Por un lado, en ambos grupos de experimentos (S)-DHPG estimula de forma significativa la hidrólisis de PIP_2 en cada una de las situaciones comparada con la actividad basal (Control: $138,42 \pm 1,26$, $p < 0,001$; βA_{25-35} : $120,27 \pm 3,65$, $p < 0,05$). Sin embargo, cuando comparamos la capacidad estimuladora del (S)-DHPG en ambas situaciones, se observa que existen diferencias

significativas entre una y otra, que se traducen en una disminución de un 13% en la estimulación de la PLC en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35} con respecto al grupo de neuronas corticales control ($p < 0,01$).

Por otro lado, el empleo de antagonistas específicos para inhibir la estimulación de la PLC mediada por (S)-DHPG no proporcionó resultados reveladores acerca de si alguno de los dos subtipos, $mGlu_1$ o $mGlu_5$, predominaba en la activación de la PLC sobre el otro o si existían cambios en la preferencia de alguno por esta vía de transducción tras la exposición al fragmento tóxico ((S)-DHPG + JNJ: Control: $105,98 \pm 5,33$; βA_{25-35} : $101,81 \pm 3,35\%$. (S)-DHPG + MPEP: Control: $111,44 \pm 4,30$; βA_{25-35} : $103,75 \pm 13,87\%$).

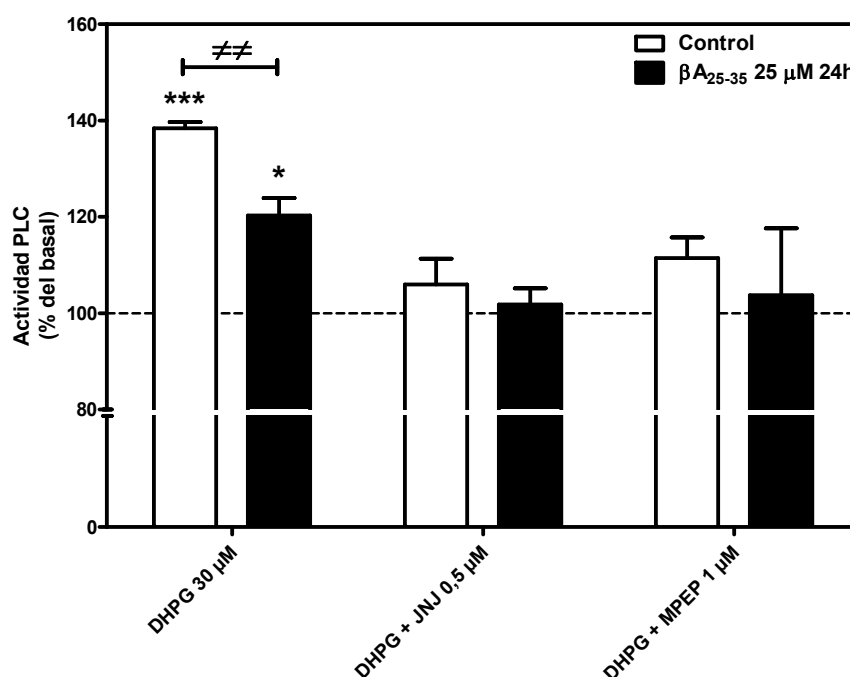


Figura 88: La exposición a βA_{25-35} afecta a la funcionalidad de los receptores metabotrópicos del grupo I. Neuronas corticales fueron expuestas o no a βA_{25-35} 25 μM durante 24 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de IP_3 . Se estudió el efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la funcionalidad del sistema estimulado por DHPG, agonista del grupo I de los receptores metabotrópicos de glutamato, así como el papel de los subtipos $mGlu_1$, inhibido por JNJ, y $mGlu_5$, inhibido por MPEP, en dicha funcionalidad. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, significativamente diferente con respecto a su basal; \neq $p < 0,01$ grupos significativamente diferentes.

Estos resultados apuntan a que existe un cambio en la capacidad de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I de estimular la hidrólisis de fosfatidilinositoles, en concreto se observa que esta capacidad disminuye en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35} , a pesar del aumento constatado en la cantidad de los receptores del grupo I en la superficie celular. Sin embargo, no se han detectado diferencias entre la capacidad de los 2 subtipos de receptores metabotrópicos del grupo I a la hora de modular esta señal en presencia de los antagonistas descritos.

Dado que se había encontrado en los experimentos de inmunofluorescencia una disminución en la cantidad de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II en la membrana plasmática de neuronas corticales expuestas a βA_{25-35} , se estudió si la principal vía de transducción a la que están acoplados los subtipos

mGlu₂ y mGlu₃ resultaba también modulada como consecuencia de la exposición al fragmento tóxico. Como se disponía de las herramientas farmacológicas necesarias para extender este estudio a los receptores metabotrópicos del grupo III, se planteó si la exposición a βA_{25-35} afectaba a la capacidad de estos para transmitir la señal a la enzima adenilato ciclasa.

El primer paso consistió en comprobar si la mera exposición de neuronas corticales a βA_{25-35} afectaba a los niveles basales de activación de la enzima AC. Así, como se expone en la Figura 89, se aprecia que no existen diferencias significativas entre los valores basales de actividad obtenidos en ambas condiciones experimentales ($p=0,499$), aunque, a simple vista, se aprecia una disminución en la actividad basal en las neuronas expuestas al fragmento tóxico. Esta disminución es de un 20% con respecto al valor medio detectado en condiciones controles.

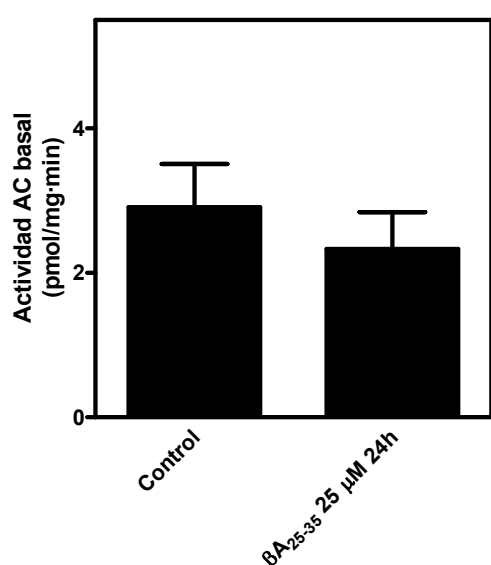


Figura 89: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la actividad AC basal. Neuronas corticales fueron expuestas o no a βA_{25-35} 25 μM durante 24 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de AMPc. Se estudió el efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la actividad AC basal. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos.

El estudio de la inhibición de la actividad AC como consecuencia de la activación de los receptores de los grupos II y III, se presenta en la Figura 90. El empleo del agonista del grupo II (2R,4R)-APDC (panel A) demuestra que no existen variaciones significativas al estimular este sistema en neuronas controles y en las expuestas a toxicidad *in vitro*, a pesar de la disminución en el número de receptores del grupo II detectada por inmunofluorescencia (% inhibición: Control: $42,76 \pm 5,60$; βA_{25-35} : $21,65 \pm 11,41\%$).

En cuanto al empleo de L-AP4 en los mismos experimentos (panel B) se observa que, en neuronas expuestas al fragmento tóxico, este ligando tiene una mayor capacidad de inhibir la actividad de la enzima AC de forma significativa (% inhibición: Control: $26,53 \pm 3,29$; βA_{25-35} : $44,77 \pm 2,83\%$; $p<0,05$). El aumento en la capacidad inhibidora de estos receptores podría apuntar a que los receptores del grupo III aumentan en estas condiciones, contribuyendo al aumento de receptores metabotrópicos detectados por unión de radioligandos.

Estos datos apuntan a que, aunque los resultados obtenidos en estos experimentos para los receptores del grupo II no hayan resultado significativos, la exposición a βA_{25-35} en neuronas corticales *in vitro* modula los sistemas formados por los grupos II y III de los receptores metabotrópicos y la enzima AC, al menos, en lo que respecta a la capacidad de éstos de inhibir la actividad AC previamente estimulada, sugiriendo que este modelo

tóxico también afecta a la transducción mediada por el segundo mensajero AMPc aunque lo hace en sentidos opuestos en cada grupo.

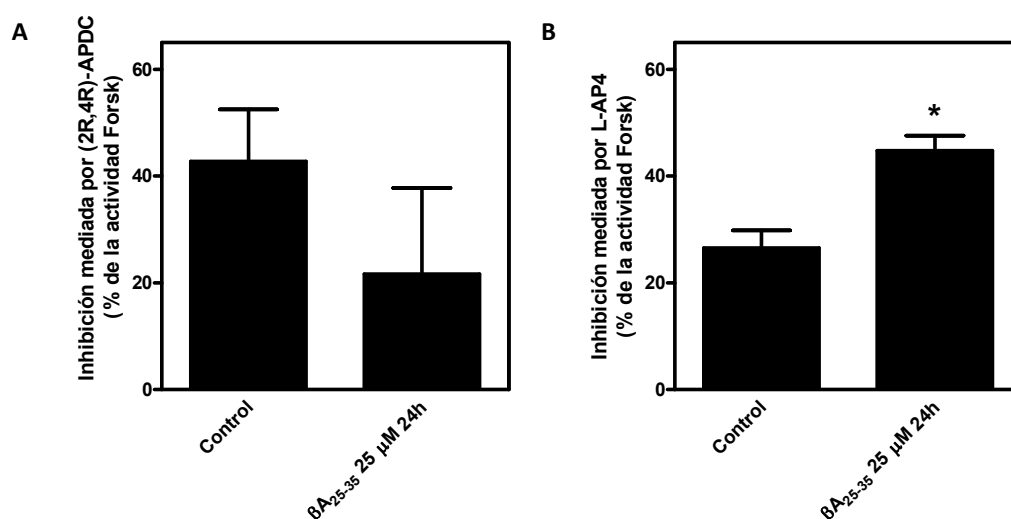


Figura 90: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la actividad AC mediada por los receptores mGlu. Neuronas corticales fueron expuestas o no a βA_{25-35} 25 μM durante 24 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de AMPc. Se estudió el efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la funcionalidad del sistema inhibido por un agonista del grupo II de los receptores metabotrópicos de glutamato, (2R,4R)-APDC 100 μM (panel A), y por un agonista del grupo III, L-AP4 100 μM (panel B). Los resultados se expresan como el tanto por ciento de la inhibición observada sobre la estimulación de forskolina 100 nM (Forsk). Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. * $p < 0,05$ significativamente diferente de su correspondiente control.

c) Receptores de adenosina.

Existen en la actualidad varias referencias bibliográficas que relacionan los receptores de adenosina con un posible papel neuroprotector en ciertas enfermedades neurodegenerativas. No obstante, este papel neuroprotector no está todavía claro. Por otro lado, ha sido recientemente descrito por este grupo de investigación el incremento del número total de receptores A_1 y A_{2A} en la corteza frontal de cerebros de pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer (Albasanz y col., 2007).

En este apartado se estudiará el efecto que ejerce *in vitro* la exposición de neuronas corticales de cerebro de rata a βA_{25-35} sobre la cantidad de receptores A_1 y A_{2A} en la superficie celular. Estos resultados se completarán con estudios de PCR a tiempo real y ensayos de actividad AC. Dado que en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer se describen varios estadios (Braak y Braak, 1998), se ha planteado el modelo de toxicidad *in vitro* en dos etapas: exposición a βA_{25-35} 25 μM durante 24 horas y durante 48 horas.

Para determinar el número total de receptores en la superficie celular se usó la técnica de unión de radioligandos, empleando [3H]DPCPX, y [3H]ZM241385, para cuantificar los receptores A_1 y A_{2A} , respectivamente.

Los resultados obtenidos en estos experimentos para determinar la densidad de receptores A_1 en la superficie de neuronas corticales se exponen en la Figura 91. En la siguiente tabla resumen se muestran los valores obtenidos para los parámetros cinéticos determinados en estos experimentos.

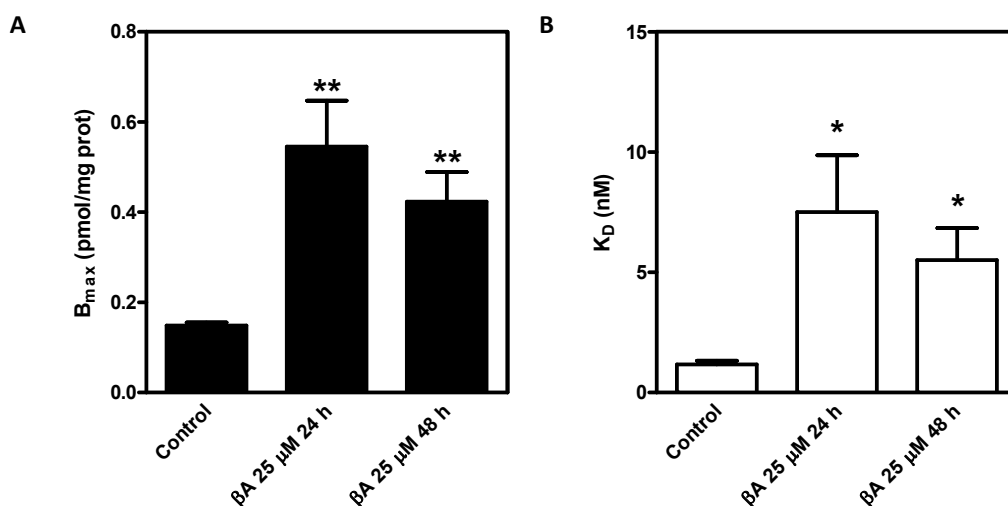


Figura 91: La exposición a βA_{25-35} modula los receptores A_1 en la superficie celular. Neuronas corticales se expusieron a βA_{25-35} 25 μM durante 24 o 48 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [3H]DPCPX. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente con respecto al control.

	Control	βA_{25-35} 25 μM 24 h	βA_{25-35} 25 μM 48 h
$B_{m\acute{a}x}$ (pmol/mg)	0,149 \pm 0,006	0,545 \pm 0,101 **	0,423 \pm 0,066 **
K_D (nM)	1,16 \pm 0,16	7,51 \pm 2,35 *	5,51 \pm 1,33 *

Tabla 29: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [3H]DPCPX en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35} . En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente respecto al correspondiente control.

Como se observa, la exposición *in vitro* a βA_{25-35} produce un aumento del número total de receptores en la superficie celular que se corresponde con un aumento de un 266% tras 24 horas de exposición y de un 184% tras 48 horas de exposición. Estos resultados son estadísticamente diferentes con respecto a los datos obtenidos en la situación control ($p < 0,01$ en ambos casos) y, sin embargo, no son estadísticamente significativos cuando son comparados entre sí ($p = 0,35$).

El análisis de los datos obtenidos para la afinidad de los receptores A_1 indica que la exposición continuada a βA_{25-35} disminuye la afinidad de estos receptores por su ligando, de modo estadísticamente significativo ($p < 0,05$ para ambos). En concreto se detectan incrementos en el parámetro K_D de 6,4 veces tras 24 horas de exposición y de 4,7 veces a las 48 horas con respecto a la situación control. De nuevo, al comparar estadísticamente estos datos entre sí no se obtuvieron resultados significativos ($p = 0,49$).

En el caso del receptor A_{2A} los resultados obtenidos para los ensayos de unión de radioligando se exponen en la Figura 92. A continuación se muestran resumidos los parámetros cuantificados en estos ensayos (Tabla 30).

Los resultados obtenidos demuestran que, en el caso del receptor A_{2A} , se necesita una exposición prolongada a βA_{25-35} para observarse efectos en su regulación a nivel de la densidad de receptor en la membrana plasmática. En concreto a las 48 horas se produce un aumento significativo de la cantidad de receptor A_{2A} de un 80% sobre la situación control ($p < 0,001$). Esta variación también es significativa con respecto a los valores obtenidos a las 24 horas ($p < 0,001$).

Por otro lado, el análisis de los datos obtenidos para las afinidades del receptor A_{2A} por su ligando revela que no existen variaciones significativas entre los datos obtenidos.

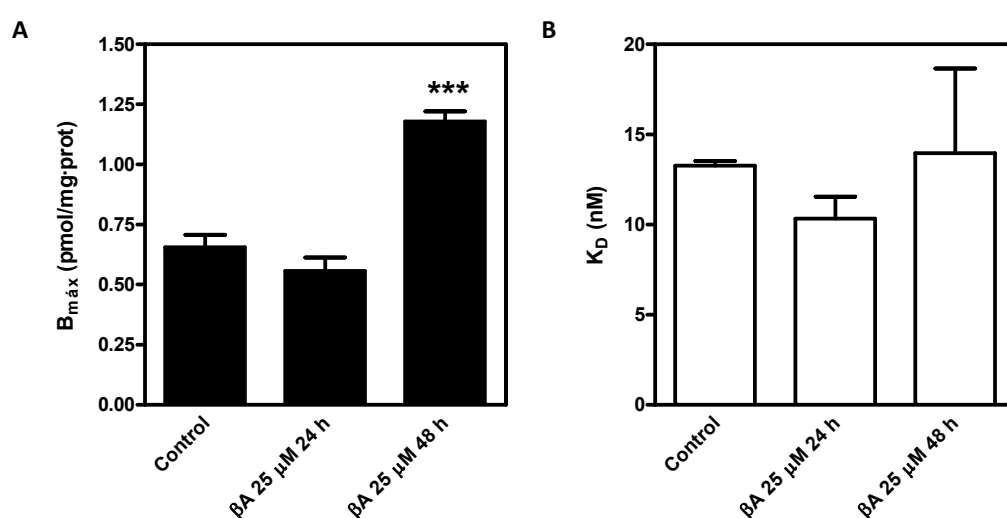


Figura 92: La exposición a βA_{25-35} modula los receptores A_{2A} en la superficie celular. Neuronas corticales se expusieron a βA_{25-35} 25 μM durante 24 o 48 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [3H]ZM241385. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

	Control	βA_{25-35} 25 μM 24 h	βA_{25-35} 25 μM 48 h
B_{max} (pmol/mg)	0,656 \pm 0,051	0,557 \pm 0,056	1,178 \pm 0,043 *** $\neq\neq$
K_D (nM)	13,26 \pm 0,26	10,33 \pm 1,22	13,96 \pm 4,69

Tabla 30: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [3H]ZM241385 en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35} . En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. *** $p < 0,001$ significativamente diferente respecto al correspondiente control. $\neq\neq$ $p < 0,001$, estadísticamente diferente con respecto a las 24 horas de tratamiento.

Estos resultados, en conjunto, indican que existe una regulación diferencial de los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} como consecuencia de la exposición *in vitro* a βA_{25-35} a nivel tanto del número de receptores como de la afinidad de los mismos por su ligando y que, en el caso del receptor A_{2A} , depende además del tiempo de exposición.

A continuación se estudió el comportamiento que seguían los genes que codifican para los receptores de adenosina A_1 , A_{2A} y A_{2B} tras la exposición a medio y largo plazo a βA_{25-35} . Para ello se recurrió, como en apartados anteriores a ensayos de RT-PCR a tiempo real.

Como se expone en la Figura 93, en todos los casos estudiados, la exposición a βA_{25-35} induce la transcripción de estos genes, tanto a medio como a largo plazo. Así, para el gen codificante para el receptor A_1 , se detectaron aumentos de un 53 y de un 65% tras 24 y 48 horas de exposición a βA_{25-35} , respectivamente, datos que, además, eran estadísticamente significativos con respecto a la situación control ($p < 0,01$ para ambos).

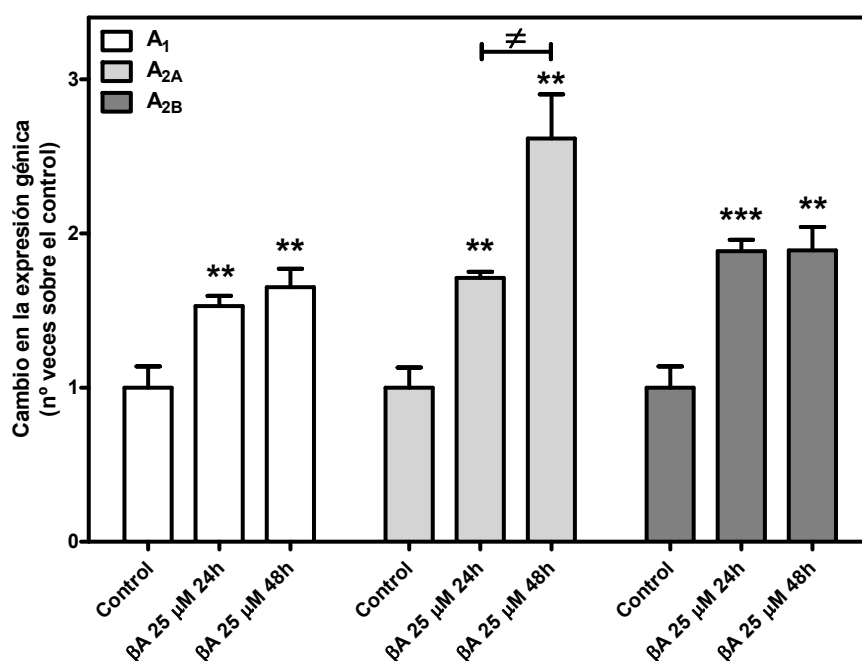


Figura 93: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión génica de A_1 , A_{2A} y A_{2B} . Neuronas corticales fueron expuestas a βA_{25-35} 25 μM durante 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, significativamente diferente con respecto al control; # $p < 0,05$ grupos significativamente diferentes.

En el caso del gen codificante para el receptor A_{2B} , las diferencias observadas fueron aún mayores entre la expresión génica en condiciones control y tras la exposición a βA_{25-35} . Así se cuantificaron incrementos de un 88 y un 89% tras 24 y 48 horas de exposición, respectivamente, con respecto a la expresión basal, resultados además estadísticamente significativos ($p < 0,001$ tras 24 horas y $p < 0,05$ tras 48 horas).

Sin embargo, para el caso del receptor A_{2A} la regulación de la expresión génica observada fue diferente. En este caso, al igual que se observó a nivel de la densidad de proteína del receptor en la superficie celular,

existen diferencias entre los efectos ejercidos por el fragmento tóxico dependiendo del tiempo de exposición al mismo. Así, tras 24 horas de exposición se observó un aumento en la expresión génica del receptor A_{2A} de un 71% ($p<0,01$). Sin embargo, cuando la exposición a βA_{25-35} se prolongaba hasta las 48 horas *in vitro* se detectó un incremento todavía mayor, en concreto, de 162% ($p<0,01$).

Además, en el caso del gen que codifica para el receptor A_{2A} se encontraron diferencias significativas al analizar los datos obtenidos a uno y a otro tiempo de exposición ($p<0,05$), observándose a las 48 horas un aumento en la expresión de un 53% con respecto al valor cuantificado a las 24 horas.

Estos resultados demuestran que la exposición a βA_{25-35} aumenta la expresión génica de todos los receptores de adenosina estudiados pero lo hace con una particularidad, en el caso del gen codificante para el receptor A_{2A} el incremento observado depende del tiempo de exposición, siendo máximo tras 48 horas. Por otro lado, los incrementos en la densidad del receptor A_1 y A_{2A} a nivel de membrana plasmática tras 48 horas de exposición a βA_{25-35} , así como de A_1 tras 24 horas, pueden entenderse como resultado de un incremento en su expresión génica. Sin embargo, los resultados observados para el receptor A_{2A} a nivel de proteína tras 24 horas podrían ser resultado de un desfase existente entre la transcripción génica y la traducción proteica.

Con el fin de cuantificar el efecto que ejercía este modelo de toxicidad *in vitro* sobre los niveles del segundo mensajero AMPc, se estudió la capacidad de los receptores de adenosina para transducir una determinada señal al interior celular. Los resultados obtenidos para la cuantificación de los niveles de AMPc en neuronas corticales controles y sometidas a la toxicidad *in vitro* de βA_{25-35} se expone en la Figura 94.

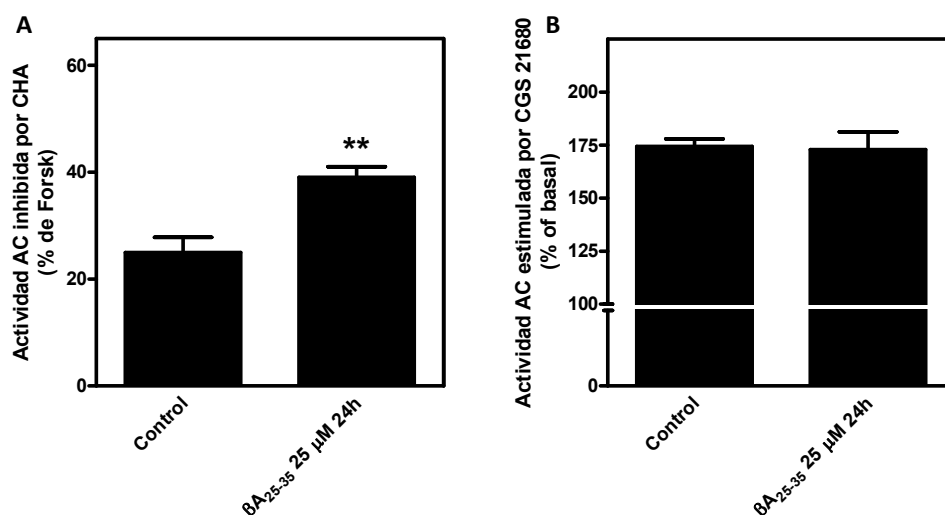


Figura 94: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la actividad AC mediada por los receptores de adenosina. Neuronas corticales fueron expuestas o no a βA_{25-35} 25 μM durante 24 horas antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de AMPc. Se estudió el efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la inhibición de la actividad AC por el receptor A_1 (panel A), empleando el agonista específico CHA a 1 μM para inhibir la actividad estimulada por forskolina 100 nM. También se comprobó el efecto ejercido en la estimulación de la actividad AC promovida por el receptor A_{2A} (panel B), para lo cual se empleó el agonista específico CGS 21680 a 1 μM . Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. ** $p<0,01$ significativamente diferente de su correspondiente control. Actividad basal: Control: 2.91 ± 0.60 ; Tratadas: 2.33 ± 0.51 pmol/mg·min.

Como se observa en el panel A, la capacidad del CHA, agonista específico del receptor A_{1L} , de inhibir aumentos en la cantidad de AMPc por inhibición del sistema de la AC resultó aumentada como consecuencia de la exposición de las neuronas corticales al fragmento tóxico durante 24 horas (% inhibición: Control: $24,95 \pm 2,89$; βA_{25-35} 25 μM 24 h: $39,02 \pm 2,00$, $p < 0,01$). En el caso del receptor A_{2A} , la capacidad de éste para modular la cantidad de AMPc tras la exposición de neuronas corticales a βA_{25-35} resultó ser similar a la observada para el mismo sistema en condiciones basales (% estimulación: Control: $174,33 \pm 3,64$; βA_{25-35} 25 μM 24 h: $172,86 \pm 8,45$). Dado que no se han detectado variaciones en la actividad AC basal tras la exposición a βA_{25-35} , estos resultados se correlacionan con los observados mediante ensayos de unión de radioligando.

Por último, se comprobó si estas condiciones afectaban a la transcripción de los factores de transcripción CREB y CREM. Para ello, se realizaron ensayos de RT-PCR a tiempo real empleando sondas específicas para ambos en muestras aisladas tras 24 y 48 horas de exposición a βA_{25-35} y se compararon con los niveles de transcripción basales de ambos factores. En ambos casos se observó una modulación similar, que se expone en la Figura 95. En concreto, en este modelo de toxicidad, tanto a tiempos medios de exposición como a tiempos largos, se observaba una disminución de la cantidad de ARNm transcrito para ambos factores de transcripción. La cuantificación de estos experimentos reveló que en el caso de CREB las disminuciones que ocurrían eran de un 39% tras 24 horas de exposición y de un 40% tras las 48 horas de exposición, ambos resultados estadísticamente significativos cuando se compararon con la situación control ($p < 0,05$).

En lo que respecta a CREM, se observó una disminución de la expresión todavía más acusada que en el caso anterior. Así, tras 24 horas de exposición la disminución era de un 60%, mientras que tras 48 horas se detectó una disminución de un 62% con respecto a los niveles de ARNm cuantificados en la situación control. Estos resultados, de nuevo, resultaron significativos desde un punto de vista estadístico ($p < 0,05$).

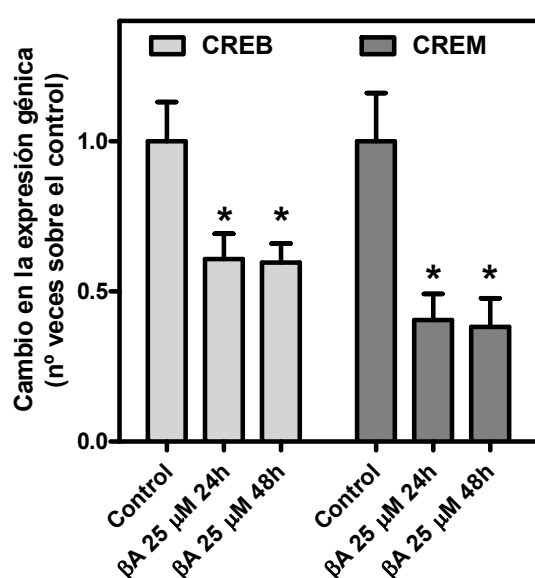


Figura 95: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión génica de los factores CREB y CREM. Neuronas corticales fueron expuestas a βA_{25-35} 25 μM durante 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes codificantes para los factores de transcripción mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$ significativamente diferente con respecto al control.

En resumen, dado que tanto CREB como CREM son factores de transcripción constitutivos que promueven la expresión de genes relacionados con la supervivencia celular, es razonable suponer que esta disminución en los niveles de ARNm de CREB y CREM afecta a la cantidad de factor en forma de proteína disponible y ello podría influir en la toxicidad ejercida por el fragmento 25-35 del péptido amiloide *in vitro*, sin descartar que haya otros motivos por los que este péptido resulte tóxico a nivel celular.

d) Tabla resumen.

A continuación se expone una tabla a modo de resumen con las principales variaciones observadas.

	βA_{25-35} 24h	βA_{25-35} 48h		βA_{25-35} 24h	βA_{25-35} 48h
Viabilidad	↓	↓	Actividad AC basal	≈	
ARNm caspasa 3	↑	↑	Actividad AC Grupo II	≈	
Actividad caspasa 3	↑	↑	Actividad AC Grupo III	↑	
B_{max} unión L-[3H]Glu	↑	↑	B_{max} unión [3H]DPCPX	↑	↑
K_D unión L-[3H]Glu	↓	↓	K_D unión L-[3H]DPCPX	↑	↑
Proteína mGlu ₁	↑	↑	B_{max} unión [3H]ZM241385	≈	↑
ARNm mGlu ₁	↑	↑	K_D unión [3H]ZM241385	≈	≈
Proteína mGlu ₅	↑	↑	ARNm A ₁	↑	↑
ARNm mGlu ₅	≈	≈	ARNm A _{2A}	↑	↑
Proteína mGlu _{2,3}	↓	↓	ARNm A _{2B}	↑	↑
Proteína PLC β_1	↓	↓	Actividad A ₁ /AC	↑	
ARNm PLC β_1	↓	↓	Actividad A _{2A} /AC	≈	
Actividad PLC basal	≈		ARNm CREB	↓	↓
Actividad PLC Grupo I	↓		ARNm CREM	↓	↓

Tabla 31: Resumen de los resultados obtenidos en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35} 25 μM . En esta tabla se exponen gráficamente los resultados numéricos descritos en este capítulo. ≈, no hay variación estadística: se observa un aumento ↑ o una disminución ↓ con respecto a la situación control.

IV.4.2 En células C6 de glioma de rata.

Como se ha expuesto en la *Introducción*, la presencia del péptido β amiloide produce varios efectos nocivos sobre las células presentes en el SNC. En concreto, la glía que rodea los depósitos del péptido β amiloide se activa volviéndose reactiva y dañando al tejido que la rodea. Dado que los receptores metabotrópicos de glutamato se encuentran alterados en varias enfermedades neurodegenerativas y además influyen en el procesamiento no amiloidogénico de la proteína APP resulta interesante comprobar el estado en el que se encuentran tras someter al modelo de C6 a una exposición prolongada al péptido β amiloide.

a) Efecto en la viabilidad.

Para estos experimentos se empleó el fragmento 25-35 del péptido amiloide, dados los motivos que se han comentado en apartados anteriores de la presente *Memoria*. El primer paso fue comprobar si el fragmento 25-35 ejercía, tal y como se propone en los antecedentes bibliográficos, un efecto tóxico sobre las células C6 afectando a la viabilidad de las mismas.

Para ello, se recurrió al test de viabilidad basado en el MTT y, como se expone en la Figura 96, panel A, del rango de concentraciones empleado durante las 6 horas de exposición a este fragmento tóxico, sólo tres proporcionaron una disminución de la viabilidad estadísticamente significativa con respecto a la situación control, estas fueron 10, 25 y 50 μ M, aunque todas las concentraciones empleadas produjeron disminuciones en la viabilidad (βA_{25-35} 6h: Control: $100,00 \pm 3,65$; 2,5 μ M: $88,03 \pm 3,16$; 5 μ M: $79,85 \pm 7,05$; 10 μ M: $70,95 \pm 5,25$, $p < 0,05$; 25 μ M: $68,93 \pm 7,68$, $p < 0,05$; 50 μ M: $63,68 \pm 5,61\%$, $p < 0,01$). El análisis estadístico de las diferencias entre el efecto en la viabilidad de estas tres concentraciones no proporcionó diferencias significativas. Por tanto se determinó que, en estos estudios se emplearía la concentración de 25 μ M del fragmento 25-35 del péptido amiloide, ya que, por un lado, producía una disminución significativa de la viabilidad en células C6 y, por otro, esta concentración ya había sido empleada con anterioridad en la bibliografía disponible.

Además se estudió el tiempo de exposición de las células C6 a βA_{25-35} para que comenzara a apreciarse su toxicidad *in vitro*. La respuesta a esta pregunta se encuentra en el panel B de la misma figura, en la que se aprecia que no se observan diferencias significativas hasta pasadas, al menos 4 horas de exposición a éste péptido, aunque a tiempos cortos se también se observaba un efecto tóxico aunque de modo no significativo (βA_{25-35} 25 μ M: Control: $100,00 \pm 4,25$; 1 h: $85,06 \pm 3,47$; 3 h: $73,19 \pm 10,06$; 4 h: $72,36 \pm 7,56$, $p < 0,05$; 6 h: $69,57 \pm 7,42\%$, $p < 0,05$).

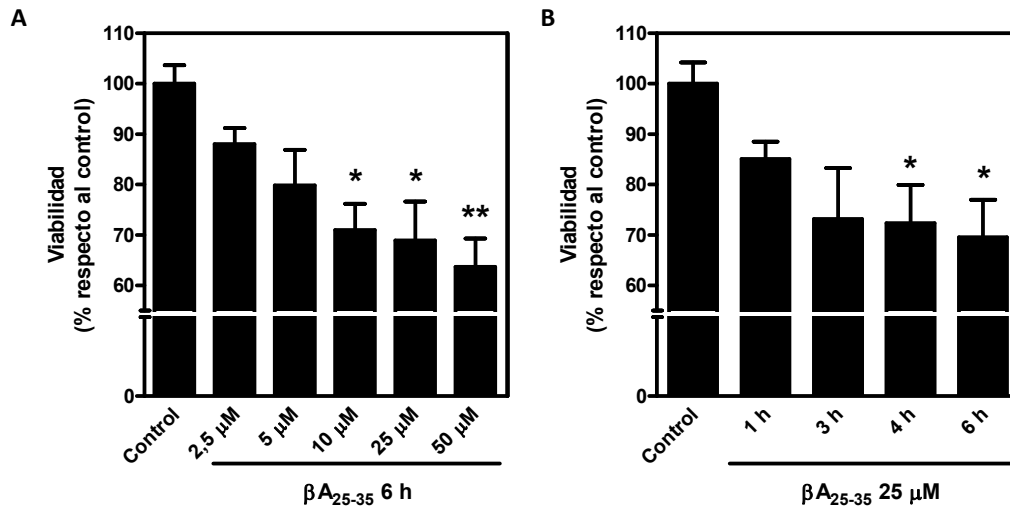
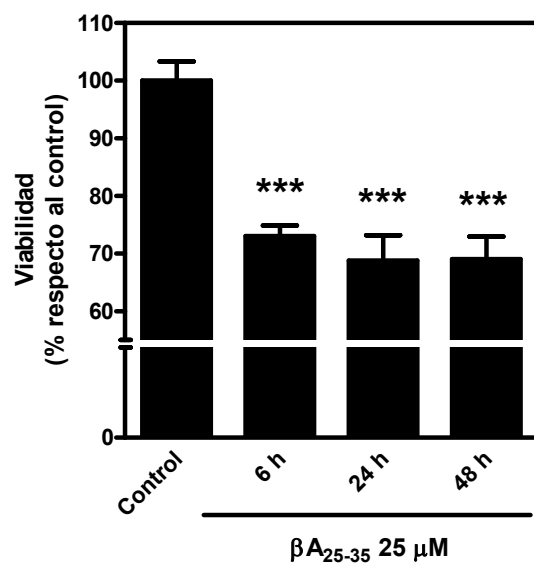


Figura 96: La exposición a βA_{25-35} disminuye la viabilidad celular (I). Células C6 se expusieron a distintas concentraciones de βA_{25-35} durante 6 horas (panel A) y a βA_{25-35} 25 μM durante 1, 3, 4 y 6 horas (panel B). Transcurrido este tiempo se midió la viabilidad celular mediante el test basado en MTT. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, expresados porcentualmente con respecto a la viabilidad de las células controles. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente con respecto al control.

Una vez comprobado el tiempo mínimo de exposición celular a βA_{25-35} para observar variaciones en la viabilidad, se estudió la toxicidad al mismo al prolongar el tiempo de exposición. Se efectuaron ensayos de viabilidad a 24 y 48 horas, incorporando como control positivo de toxicidad la exposición al fragmento tóxico durante 6 horas. Los resultados obtenidos en estas condiciones se exponen en la Figura 97, y, como se observa, revelan que el efecto tóxico de βA_{25-35} sobre las células C6 *in vitro* no depende del tiempo de exposición, una vez superado el umbral mínimo, sino que no se alcanzan disminuciones en la viabilidad mayores a las ya descritas, así tras 24 horas y 48 horas de exposición se observó una disminución en la viabilidad de un 31% con respecto al control, similar a la descrita a las 6 horas (βA_{25-35} 25 μM : Control: $100,00 \pm 3,30$; 6 h: $73,04 \pm 1,86$, $p < 0,001$; 24 h: $68,77 \pm 4,39$, $p < 0,001$; 48 h: $69,04 \pm 3,93$, $p < 0,001$).

Figura 97: La exposición a βA_{25-35} disminuye la viabilidad celular (II). Células C6 se expusieron a distintas concentraciones de βA_{25-35} durante 24 horas (panel A) y a βA_{25-35} 25 μM durante 24 y 48 horas (panel B). Transcurrido este tiempo se midió la viabilidad celular mediante el test basado en MTT. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, expresados porcentualmente con respecto a la viabilidad de las células controles. *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.



Un resumen de los resultados obtenidos en estos experimentos de viabilidad empleando βA_{25-35} en las células C6 se expone en la Figura 98, en la que se muestra cómo una vez que el fragmento alcanza su efecto tóxico máximo, este efecto se mantiene en todos los tiempos posteriores ensayados.

El último ensayo necesario para demostrar la validez de este modelo de toxicidad *in vitro* era incorporar el empleo del péptido amiloide completo a estos experimentos. Los experimentos de viabilidad realizados con el péptido amiloide completo se exponen en la Figura 99. Como se esperaba, la exposición de las células C6 a βA_{1-42} disminuye su viabilidad en un 28% con respecto a la situación control (Control: $100,00 \pm 0,88$; βA_{1-42} 25 μM 24h: $73,04 \pm 1,27\%$, $p < 0,001$). Cuando se compararon estadísticamente las disminuciones observadas tras 24 horas de exposición a βA_{1-42} y a βA_{25-35} no se obtuvieron diferencias significativas.

Estos resultados apuntan a que el empleo de βA_{25-35} inducía muerte celular sobre las células C6 en la misma magnitud que el fragmento completo, lo cual validaba el modelo de estudio empleado, tal y como era de esperar según los antecedentes bibliográficos.

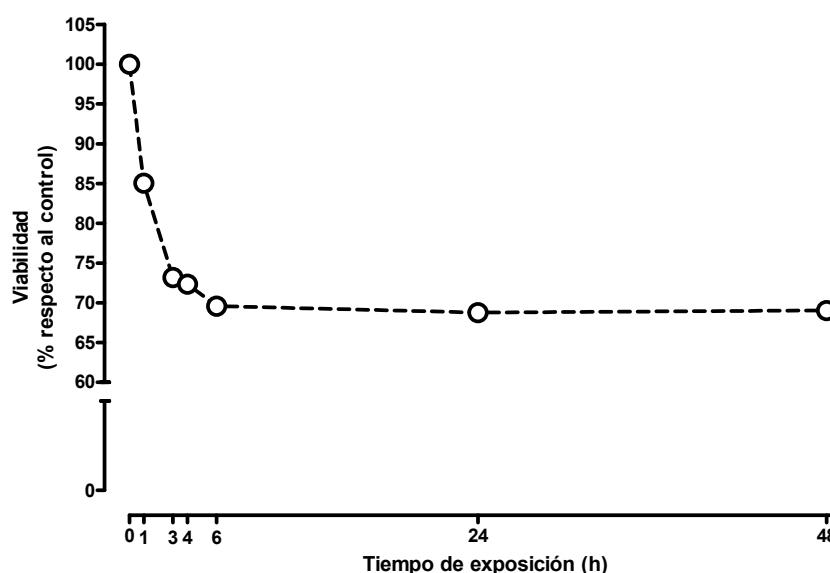


Figura 98: Resumen del efecto observado por exposición a βA_{25-35} en el tiempo. Esta Figura recoge las medias expuestas a distintos tiempos en las Figuras 96 y 97.

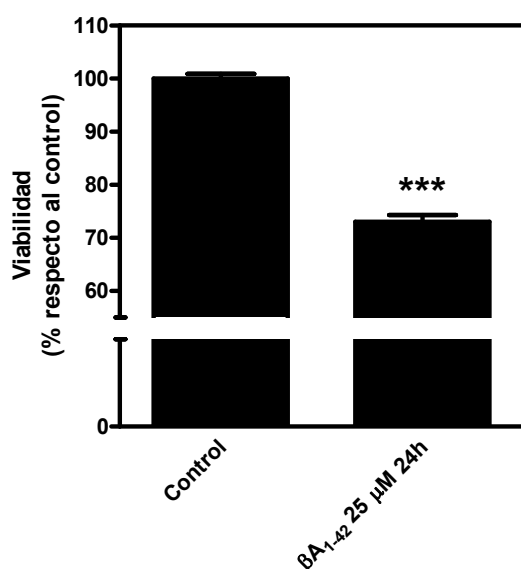
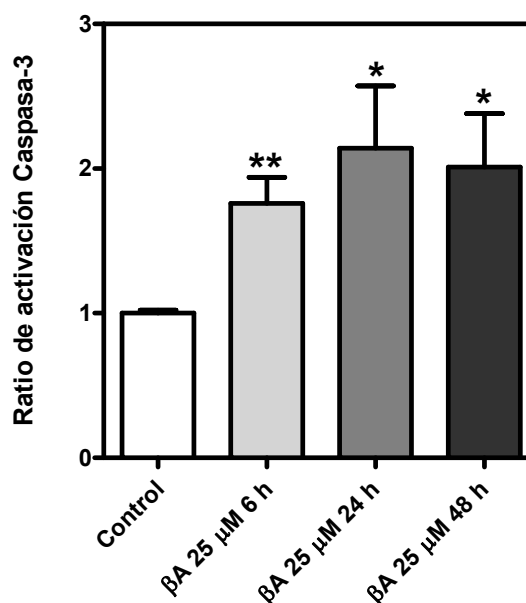


Figura 99: La exposición a βA_{1-42} disminuye la viabilidad celular de forma similar a βA_{25-35} . Células C6 se expusieron a βA_{1-42} durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se midió la viabilidad celular mediante el test basado en MTT. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, expresados porcentualmente con respecto a la viabilidad de las células controles. *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

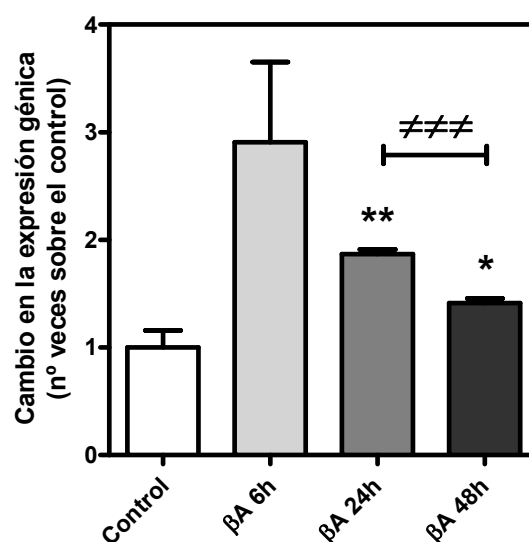
Según los datos bibliográficos disponibles, la muerte celular producida por la exposición al péptido amiloide es consecuencia, en parte, de la activación de la vía de las caspasas. Por este motivo, el siguiente paso fue comprobar el efecto que ejercía la exposición a βA_{25-35} sobre la activación de esta vía. Como se observa en la Figura 100, la exposición de las células C6 a βA_{25-35} induce la activación de la vía de las caspasas tanto a tiempos cortos (6 horas de exposición) como a tiempos más prolongados (24 y 48 horas). Estos resultados eran además todos estadísticamente significativos cuando se comparaban con la situación control (Ratio de activación: 6 h: $1,76 \pm 0,18$, $p < 0,01$; 24 h: $2,14 \pm 0,43$, $p < 0,05$; 48 h: $2,01 \pm 0,37$, $p < 0,05$).

Figura 100: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la actividad de caspasa 3. Células C6 fueron expuestas a βA_{25-35} 25 μM durante 6, 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control. Posteriormente se realizaron ensayos de actividad enzimática específicos de caspasa 3 empleando el kit comercial descrito en *Métodos*. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos pases. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente con respecto a la actividad control.



Con el objetivo de validar por completo el modelo se estudió la repercusión que tenía la exposición de las células C6 a βA_{25-35} sobre la expresión génica de la caspasa 3. Para ello se realizaron ensayos de RT-PCR a tiempo real empleando sondas específicas para el gen correspondiente. Así, los resultados obtenidos, expuestos en la Figura 101, revelan que la exposición a βA_{25-35} produce una activación de la transcripción del gen correspondiente a la caspasa 3, siendo esta activación dependiente del tiempo de exposición. Así, se observa a las 6 horas un aumento de 2,9 veces en la expresión de este ARNm sobre la situación control, resultado que, por otro lado, está cercano a ser estadísticamente significativo ($p = 0,066$). Sin embargo, si se prolonga el tiempo de exposición al fragmento tóxico se observa un aumento moderado, que se corresponde con un incremento de 1,9 veces a las 24 horas y de 1,4 veces a las 48 horas. Estos resultados son, además, estadísticamente diferentes con respecto al control ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente). El hecho de que la modulación de la expresión génica del gen codificante para la caspasa 3 sea dependiente del tiempo lo corrobora la comparación estadística de los datos obtenidos a 24 y a 48 horas, la cual arroja diferencias estadísticamente significativas entre uno y otro grupo de experimentos ($p < 0,001$).

Figura 101: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión de caspasa 3. Células C6 fueron expuestas a βA_{25-35} 25 μM durante 6, 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando una sonda específica para el gen codificante para la caspasa 3. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente con respecto al control; ### $p < 0,001$ valores significativamente diferentes.



b) Receptores metabotrópicos de Glutamato.

Una vez comprobada la validez del modelo de estudio se procedió a estudiar el efecto que ejercía el fragmento 25-35 del péptido amiloide sobre el sistema de los receptores metabotrópicos de glutamato. Para ello, lo primero fue comprobar si la exposición a dicho fragmento afectaba a la presencia de los receptores metabotrópicos en la superficie celular empleando de nuevo el ensayo de unión de radioligando usando L-[3H]Glu. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 102. Como se observa en el panel A, la exposición a βA_{25-35} produce un aumento gradual de la presencia de los receptores metabotrópicos en la membrana plasmática celular. El número total de receptores metabotrópicos se ve aumentado un 27% a las 6 horas de exposición, un 54% a las 24 horas y un 66% a las 48 horas, siendo además estos resultados significativamente diferentes de los obtenidos para la situación control (Control: $133,75 \pm 9,54$; βA_{25-35} 25 μM : 6h, $170,16 \pm 11,54$, $p < 0,05$; 24h, $205,68 \pm 26,39$, $p < 0,05$; 48h, $222,57 \pm 15,85$ pmol/mg prot, $p < 0,001$). Por otro lado, se detectaron diferencias significativas entre la densidad de receptores metabotrópicos a las 6 horas de exposición y tras 48 horas de exposición ($p < 0,05$) las cuales se correspondían con un aumento de un 31% en la cantidad total de receptores en la superficie celular.

En cuanto al análisis de los datos obtenidos para la afinidad de los receptores los resultados se exponen en el panel B de la misma figura. La exposición a βA_{25-35} tiene efectos variados sobre la afinidad de los receptores metabotrópicos por su ligando, ya que, aunque siempre produce el mismo efecto, un aumento de la K_D o lo que es lo mismo una disminución de la afinidad, este efecto no es gradual y varía entre los distintos tiempos de exposición estudiados. Como se observa, a las 6 horas de exposición el efecto sobre la K_D es máximo y los receptores metabotrópicos alcanzan su menor afinidad por su ligando, aumentando la K_D 3,7 veces con respecto al control (Control: $707,59 \pm 44,45$; βA_{25-35} 25 μM 6h: $2646,20 \pm 254,49$ nM, $p < 0,001$). Sin embargo, a las 24 horas de exposición las diferencias observadas dejan de ser significativas con respecto a la situación control y el valor de la K_D disminuye con respecto a lo observado a las 6 horas, observándose valores de afinidad similares al control (βA_{25-35} 25 μM 24h: $807,30 \pm 84,93$ nM). Si se prolongan más los tiempos de

exposición a βA_{25-35} se observa que a las 48 horas de exposición la afinidad detectada para los receptores metabotrópicos de glutamato vuelve a disminuir, aumentando el valor de la K_D en 1,7 veces con respecto a la situación control (βA_{25-35} 25 μM 48h: $1233,97 \pm 207,77$ nM, $p < 0,05$). Por otro lado algunas de estas variaciones descritas en la K_D son significativas entre sí, así la diferencia observada entre la exposición al fragmento tóxico empleado durante 6 horas y 24 horas se traduce en una disminución en la K_D de un 67% entre uno y otro tiempo ($p < 0,001$) y la diferencia observada entre la exposición durante 6 y 48 horas al fragmento tóxico empleado supone una disminución en la K_D de un 53% ($p < 0,01$). Cabe destacar, además, que la diferencia descrita entre la afinidad detectada tras las 24 y 48 horas de exposición no llega a ser significativa ($p = 0,13$). Estos resultados, tomados en conjunto, apuntan a que la exposición a βA_{25-35} produce diferentes efectos en el número de receptores y en la afinidad de los mismos.

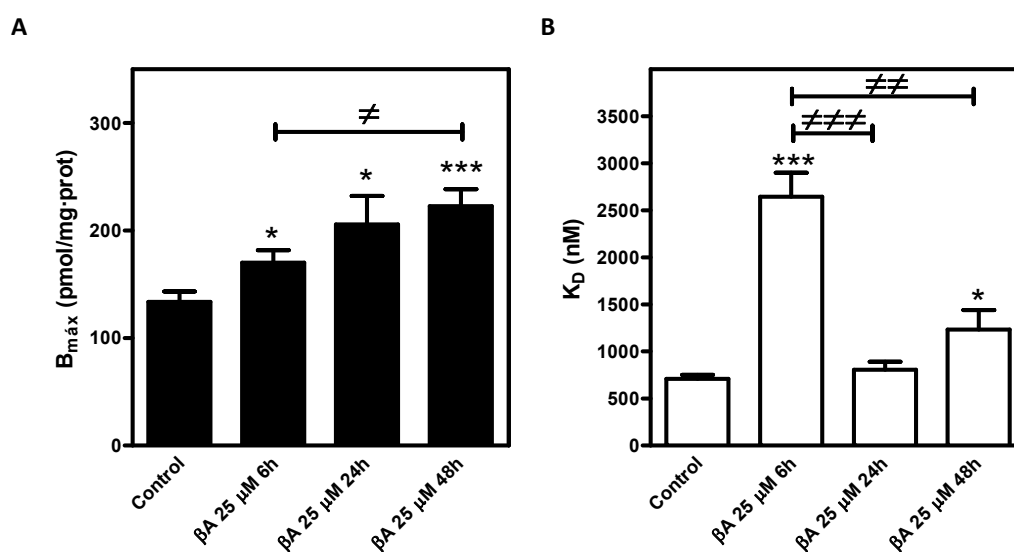
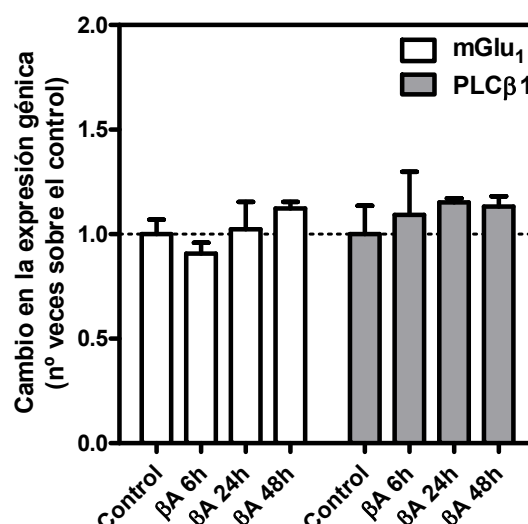


Figura 102: La exposición a βA_{25-35} modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular. Células C6 se expusieron a βA_{25-35} 25 μM durante 6, 24 o 48 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando L-[3H]Glu. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes pases. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ diferencias significativas Con respecto a las 6 horas.

A continuación se procedió a comprobar el efecto que ejercía la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión génica del receptor metabotrópico de glutamato del tipo 1 y de la isoforma β_1 de la PLC. Para ello se recurrió a la técnica de PCR en tiempo real empleando sondas específicas para cada gen. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 103. Como se muestra, la exposición de las células C6 a βA_{25-35} , ya sea a tiempos cortos o más prolongados, no ejerce influencia alguna sobre la expresión génica del receptor metabotrópico de glutamato del tipo 1 así como de la fosfolipasa $C\beta_1$.

Figura 103: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión génica de mGlu₁ y PLC β ₁. Células C6 fueron expuestas a βA_{25-35} 25 μ M durante 6, 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras.



Con el fin de profundizar más en la modulación descrita a nivel de proteína mediante ensayo de unión de radioligando se emplearon técnicas inmunocitoquímicas. Para ello, se usaron anticuerpos dirigidos contra elementos extracelulares de determinados receptores metabotrópicos, de tal manera que la fijación sin permeabilización nos permitió que los anticuerpos empleados se unieran sólo a los receptores expuestos en la superficie celular, dándonos una idea acerca de la modulación que sufrían como consecuencia de la exposición a βA_{25-35} . Se emplearon anticuerpos específicos de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I (subtipos 1 y 5) y del grupo II (subtipos 2 y 3).

Imágenes representativas de los experimentos realizados en estas condiciones se muestran en la Figura 104. Un diagrama de barras que representa la cuantificación de la fluorescencia obtenida se expone en la Figura 105. Por último, un resumen de los datos obtenidos así como del análisis estadístico se expone a continuación en la Tabla 32.

Como se observa en la Tabla 32, sólo el subtipo 1 de los receptores metabotrópicos de glutamato experimenta una variación significativa como consecuencia de la exposición de las células C6 a βA_{25-35} . Además esta variación es significativa ($p < 0,001$) independientemente de si el periodo de exposición al fragmento tóxico del péptido amiloide es corto o es más prolongado.

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia indican que el aumento observado en la unión de L-[³H]Glu no puede ser producido como consecuencia del aumento del número de receptores de los grupos I y II, ya que, según los experimentos de inmunocitoquímica, ninguno de los receptores de los grupos I y II aumentan su presencia en membrana como consecuencia de la exposición al péptido, es más la presencia de los del subtipo 1 disminuye significativamente, por lo que experimentos adicionales deben realizarse para confirmar el papel del grupo III en este aumento.

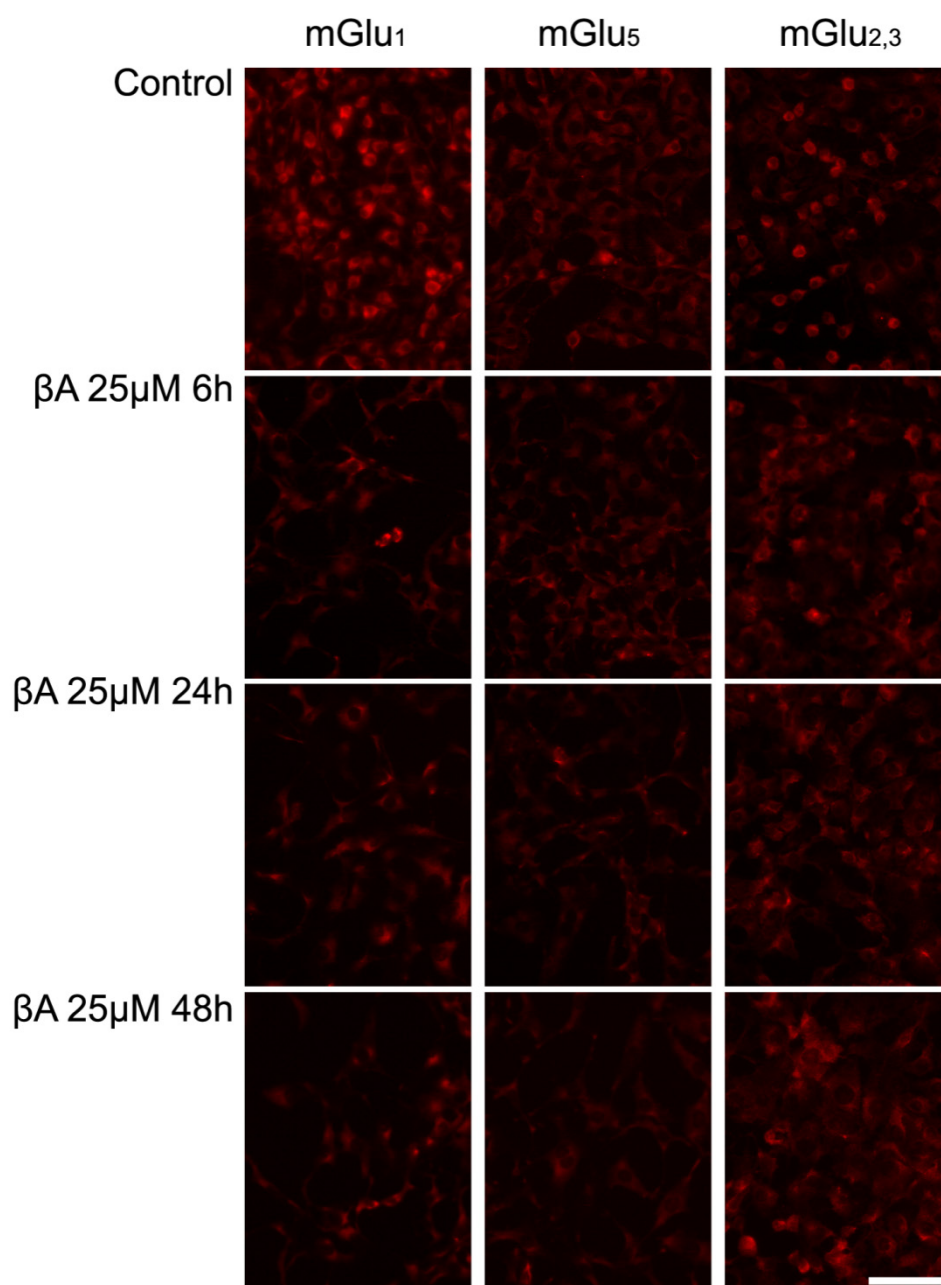


Figura 104: Inmunodetección de mGlu₁, mGlu₅ y mGlu_{2,3} tras la exposición a βA₂₅₋₃₅ (I). Micrografías representativas de los resultados obtenidos tras los experimentos de inmunofluorescencia al emplear los anticuerpos para mGlu₁, mGlu₅ y mGlu_{2,3} en células C6 controles y expuestas a βA₂₅₋₃₅ 25 μM durante 6, 24 y 48 horas. La barra representa 62 μm.

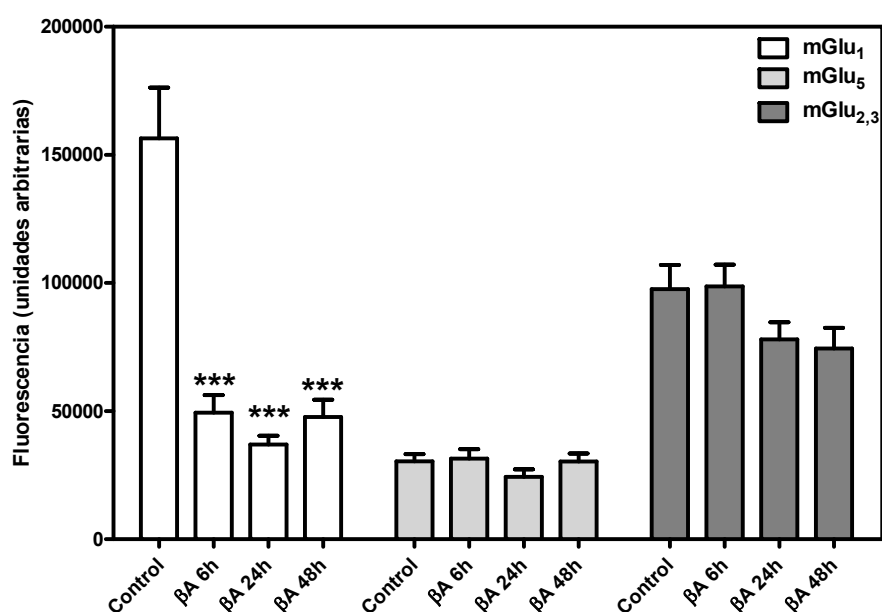


Figura 105: Inmunodetección de mGlu₁, mGlu₅ y mGlu_{2,3} tras la exposición a βA₂₅₋₃₅ (II). Diagrama de barras que resume los resultados expuestos en la Figura 104. Las cuantificaciones se realizaron usando el *software* LAS AF empleando un mínimo de 30 campos por condición experimental. Se exponen las medias ± SEM obtenidas para cada condición experimental. *** p<0,001 significativamente diferente con respecto al control.

	βA ₂₅₋₃₅ 25 μM 6h	βA ₂₅₋₃₅ 25 μM 24h	βA ₂₅₋₃₅ 25 μM 48h
mGlu ₁	↓ ***	↓ ***	↓ ***
mGlu ₅	ns	ns	ns
mGlu _{2,3}	ns	ns	ns

Tabla 32: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de inmunofluorescencia en células C6 expuestas a βA₂₅₋₃₅. Se muestra el sentido de la variación observada con respecto al correspondiente control mediante flechas: ↑ aumenta; ↓ disminuye. *** p<0,001 significativamente diferente con respecto al control.

Por último se comprobó si la exposición a βA₂₅₋₃₅ ejercía algún efecto sobre la enzima que participa en la principal vía de transducción acoplada al grupo I de los receptores metabotrópicos de glutamato, ya que, según se postula en la bibliografía, puede ser un aumento excesivo del calcio intracelular el causante del efecto tóxico inducido por βA₂₅₋₃₅. Para ello, se recurrió de nuevo a técnicas inmunocitoquímicas clásicas empleando esta vez el anticuerpo específico para la isoforma β₁ de la enzima PLC así como un proceso de permeabilización tras la fijación con el fin de exponer al anticuerpo los antígenos intracelulares.

Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 106. En el panel A se muestran imágenes representativas de algunos campos fotografiados tras la inmunofluorescencia mientras que en el panel B se muestra una gráfica con el resumen de los datos obtenidos tras la cuantificación, así como el análisis

estadístico realizado. Como se observa, la única variación significativa detectada ante la exposición de las células C6 a βA_{25-35} en estas condiciones es una disminución significativa ($p < 0,05$) de la señal fluorescente obtenida para $PLC\beta_1$ a las 24 horas de exposición.

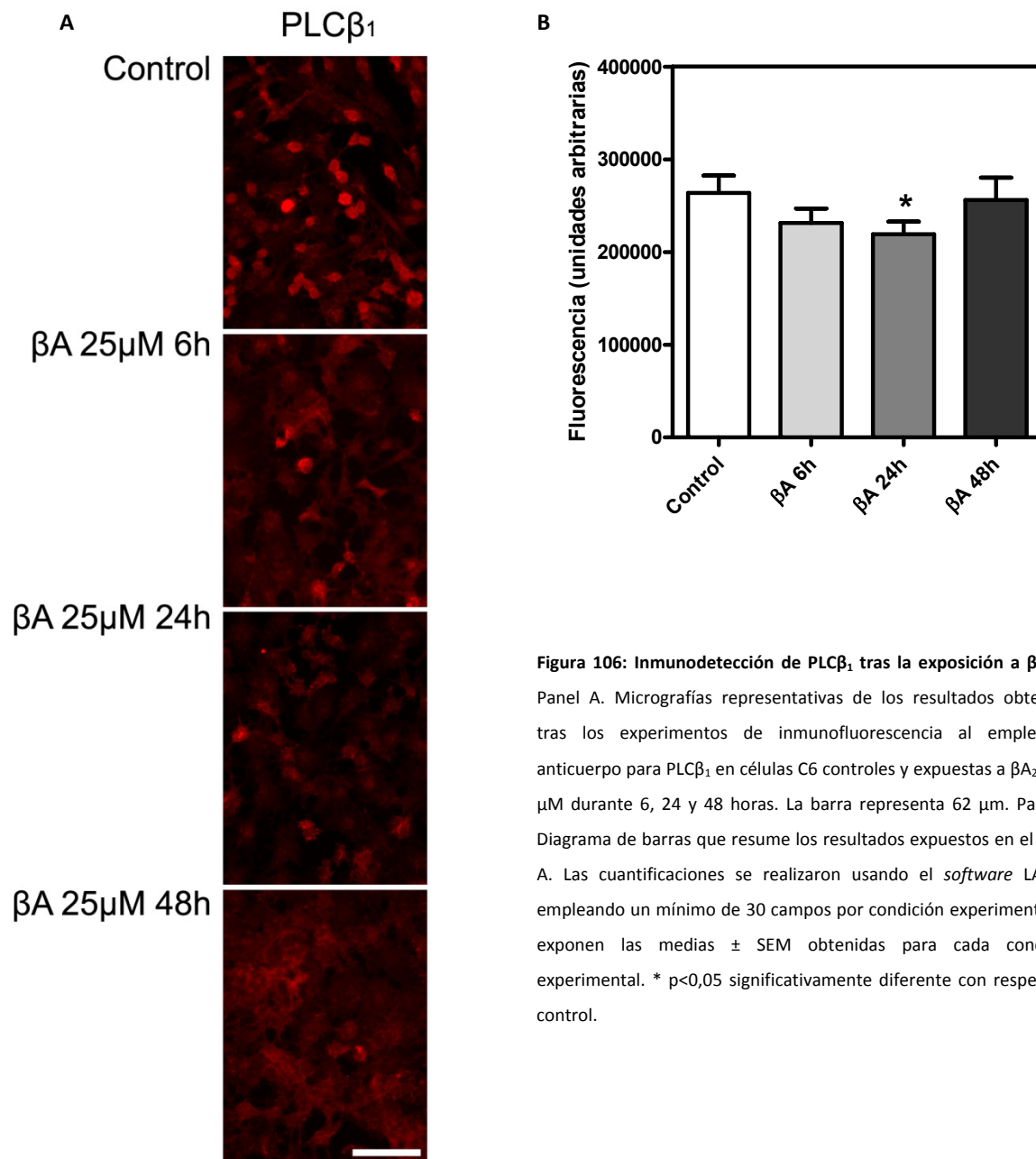


Figura 106: Inmunodetección de $PLC\beta_1$ tras la exposición a βA_{25-35} . Panel A. Micrografías representativas de los resultados obtenidos tras los experimentos de inmunofluorescencia al emplear el anticuerpo para $PLC\beta_1$ en células C6 controles y expuestas a βA_{25-35} 25 μ M durante 6, 24 y 48 horas. La barra representa 62 μ m. Panel B. Diagrama de barras que resume los resultados expuestos en el panel A. Las cuantificaciones se realizaron usando el *software* LAS AF empleando un mínimo de 30 campos por condición experimental. Se exponen las medias \pm SEM obtenidas para cada condición experimental. * $p < 0,05$ significativamente diferente con respecto al control.

c) Receptores de adenosina.

Como ya se ha comentado, se están relacionando los receptores de adenosina con ciertas enfermedades neurodegenerativas, incluso en el caso de la enfermedad de Alzheimer se postula que el empleo de antagonistas del receptor A_{2A} puede producir mejoras frente al daño celular que ocasiona la exposición a βA_{25-35} (Dall'Igna y col., 2003). Por este motivo se estudió si la exposición de las células C6 a βA_{25-35} modulaba los receptores de adenosina.

Con este fin se empleó la técnica de unión de radioligandos. Para estudiar el receptor A_1 se empleó [3 H]DPCPX. Como se observa en la Figura 107, panel A, la exposición a βA_{25-35} produce un aumento significativo del número de receptores A_1 que se encuentran en la superficie celular (Control: $0,567 \pm 0,026$; βA_{25-35} 25 μ M: 6h: $1,266 \pm 0,123$, $p < 0,001$; 24h: $1,585 \pm 0,058$, $p < 0,001$; 48h: $1,547 \pm 0,244$ pmol/mg prot, $p < 0,01$). Este aumento se corresponde con un incremento porcentual de un 123, 179 y 173% para los tiempos de exposición 6, 24 y 48 horas, respectivamente.

El análisis estadístico de los datos obtenidos a los distintos tiempos desvela que no existen diferencias significativas entre el efecto observado tras la exposición a βA_{25-35} durante tiempos cortos y durante periodos más prolongados, aunque se observa una cierta tendencia. En el panel B de la misma figura se observan los efectos que ejerce la exposición a βA_{25-35} sobre la afinidad del receptor A_1 por su ligando. Como se expone, no se aprecian variaciones aparentes en la K_D .

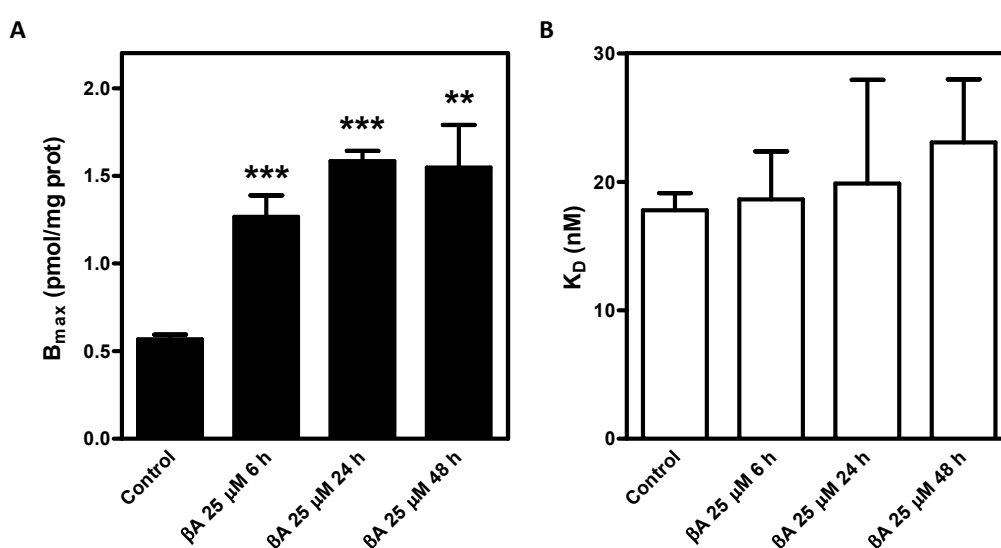


Figura 107: La exposición a βA_{25-35} modula los receptores A_1 en la superficie celular. Células C6 se expusieron a βA_{25-35} 25 μ M durante 6, 24 o 48 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [3 H]DPCPX. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes pases. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

En lo que al estudio del receptor A_{2A} se refiere se empleó [3 H]ZM241385 en el ensayo de unión de radioligando. Los resultados obtenidos en estos experimentos tras la exposición de las células C6 a βA_{25-35} se resumen a continuación en la Figura 108.

Se aprecia que este fragmento tóxico produce un aumento significativo del número de receptores A_{2A} sobre la superficie celular a todos los tiempos ensayados (Control: $0,432 \pm 0,011$; βA_{25-35} 25 μ M: 6h: $1,300 \pm 0,074$, $p < 0,001$; 24h: $1,110 \pm 0,088$, $p < 0,001$; 48h: $0,850 \pm 0,079$ pmol/mg prot, $p < 0,01$). Sin embargo, el efecto de la exposición a βA_{25-35} descrito sobre los receptores A_{2A} tiene una particularidad; es máximo a las 6 horas de exposición (201% de incremento sobre el control) y, según se prolonga el tiempo de exposición, el efecto va

disminuyendo (157% de incremento tras 24 horas y sólo 97% tras 48 horas de exposición). Esta atenuación del efecto resulta además significativa desde el punto de vista estadístico ($p < 0,01$ entre los datos a 6 y 48 horas).

Por otro lado, como se expone en el panel B de la misma Figura, la exposición a βA_{25-35} no produce ningún efecto significativo sobre la afinidad de estos receptores sobre su ligando.

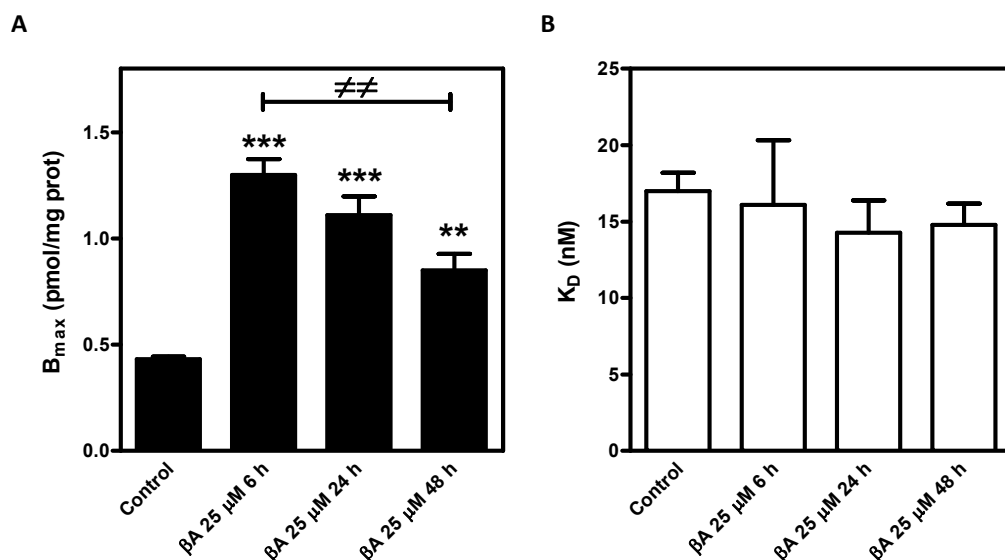


Figura 108: La exposición a βA_{25-35} modula los receptores A_{2A} en la superficie celular. Células C6 se expusieron a βA_{25-35} 25 μM durante 6, 24 o 48 horas. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [3H]ZM241385. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes pases. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control; \neq $p < 0,01$ variación entre grupos significativamente diferente.

De los resultados obtenidos se extrae que la exposición a βA_{25-35} modula la densidad de los receptores A_1 y A_{2A} en la membrana plasmática de las células C6, aumentando en ambos casos su presencia sin afectar a su afinidad, pero con la particularidad de que mientras que el efecto sobre el receptor A_1 no depende forma clara del tiempo de exposición, el efecto sobre el receptor A_{2A} es dependiente del tiempo y se cumple que, para los tiempos ensayados, es mayor cuanto menor es el tiempo de exposición.

A continuación se procedió a estudiar si la exposición a βA_{25-35} en C6 modulaba la expresión génica de los receptores de adenosina. Para ello se recurrió a la técnica de la RT-PCR en su variante a tiempo real empleando sondas específicas para los receptores de adenosina. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 109, en la que se aprecia que, en general, la exposición al mencionado agente tóxico aumenta la expresión de los receptores de adenosina A_1 y A_{2B} y no modula la de A_{2A} y A_3 .

Así, para el gen codificante para el receptor A_1 se observa un aumento de la expresión génica como consecuencia de la exposición de las células C6 a βA_{25-35} , observándose aumentos de un 74% a las 6 y a las 24 horas y de un 58% a las 48 horas de exposición. Sin embargo, este aumento fue significativo sólo tras 6 y 24 horas de exposición ($p < 0,05$ ambas).

En el caso de A_{2B} el efecto observado fue similar, la exposición a βA_{25-35} incrementaba la expresión un 82, 92 y 44% a las 6, 24 y 48 horas de exposición, respectivamente, siendo todas estas variaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$ tras 6 y 48 horas de exposición y $p < 0,01$ tras 24 horas de exposición).

Cabe destacar que para los genes correspondientes a los receptores A_{2A} y A_3 no se detectó modulación de la expresión génica como consecuencia de la exposición a βA_{25-35} en células C6.

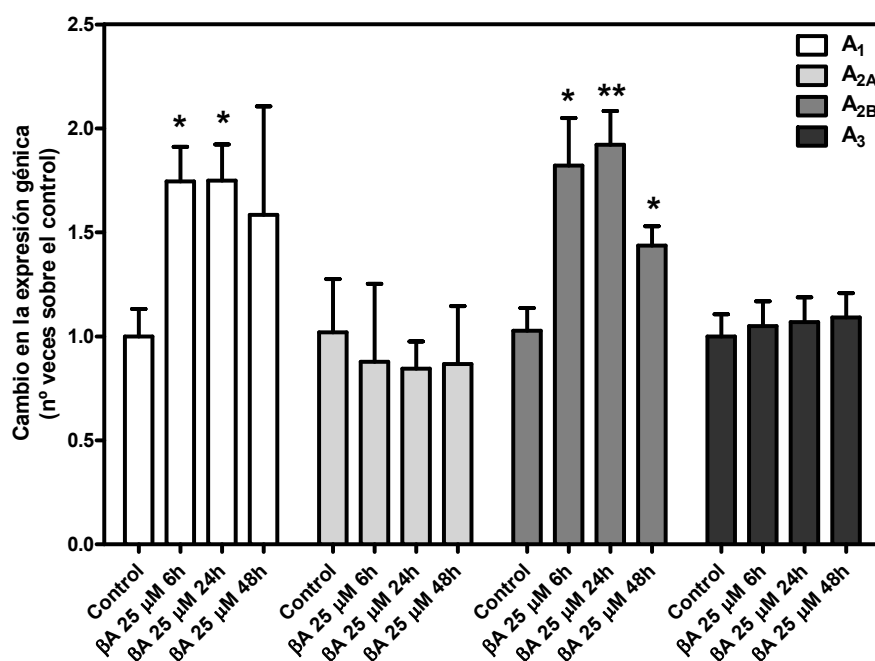


Figura 109: Efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión génica de A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 . Células C6 fueron expuestas a βA_{25-35} 25 μM durante 6, 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, significativamente diferente con respecto al control.

Por tanto, se podría decir que la exposición a βA_{25-35} en células C6 modula la expresión de los genes correspondientes a los receptores de adenosina de forma diferente, ya que aumenta la expresión de A_1 y A_{2B} pero no la de A_{2A} y A_3 . Por otro lado, en el caso del receptor A_1 , los cambios observados a nivel de la expresión génica podrían explicar los aumentos en la cantidad de proteína que se describieron en apartados anteriores. Sin embargo, en el caso del receptor A_{2A} , estas variaciones en la cantidad de proteína sólo podrían ser resultado de modificaciones post transcripcionales, ya que los niveles de ARNm del gen que codifica para este receptor no se ven modulados en este modelo de toxicidad.

Para terminar los experimentos con βA_{25-35} en células C6 se realizaron ensayos de RT-PCR a tiempo real con objeto de cuantificar las diferencias en la expresión génica de los factores de transcripción CREB y CREM, ambos relacionados con la vía del AMPc y con procesos de neurodegeneración (Mantamadiotis y col., 2002).

Como se expone en la Figura 110, paneles A y B, la modulación de la expresión génica de estos dos factores es compleja, aunque la exposición a βA_{25-35} los modula de la misma manera. Así, a tiempos cortos de exposición al fragmento 25-35 se produce una disminución de ambos factores, en concreto supone una pérdida del 12% del ARNm detectado de CREB ($p < 0,05$) y de un 24% para el ARNm de CREM ($p < 0,05$). Sin embargo, si se prolonga el tiempo de exposición se observa el efecto contrario, el ARNm codificante para ambos factores aumenta, un 26% en el caso de CREB ($p < 0,001$) y un 21% en el caso del factor CREM ($p < 0,05$). Si se prolonga la exposición hasta el último tiempo estudiado se aprecia que, a 48 horas de exposición, los niveles de ARNm de ambos factores de transcripción son similares a los cuantificados en la situación control.

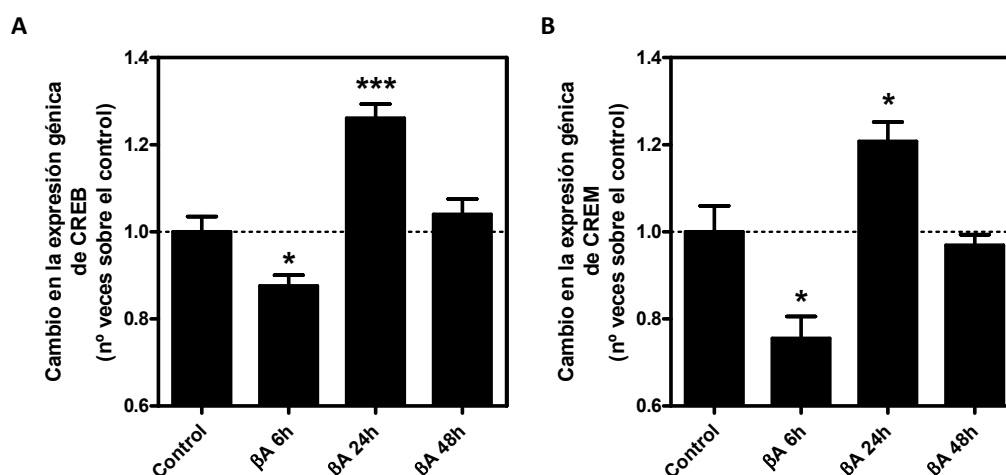


Figura 110: El efecto de la exposición a βA_{25-35} sobre la expresión génica de los factores CREB y CREM depende del tiempo de exposición. Células C6 fueron expuestas a βA_{25-35} 25 μM durante 6, 24 o 48 horas o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes codificantes para los factores de transcripción CREB (panel A) y CREM (panel B). Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

Estos resultados indican que la modulación de los factores de transcripción CREB y CREM es compleja en células C6 expuestas a βA_{25-35} y depende del tiempo de exposición, lo que sugiere que el papel que estos factores de transcripción juegan en la modulación de la expresión génica tiene, al menos tres fases: a tiempos cortos de exposición al fragmento tóxico (6 h) la expresión de CREB y CREM disminuye, con lo que, a priori, se transcriben en menor cantidad genes implicados en proliferación y supervivencia y podría estar relacionado con la disminución en la viabilidad descrita. Sin embargo, tras 24 horas de exposición, ambos factores aumentan su expresión, lo que podría estar relacionado con el hecho demostrado de que la viabilidad no aumenta al prolongar el tiempo de exposición. Por último, tras 48 horas de exposición los niveles de expresión de CREB y CREM ya se han normalizado, lo que podría sugerir que, en estas condiciones, las células C6 no requieren una mayor expresión de CREB y CREM para sobrevivir a βA_{25-35} , pudiendo verse compensado su efecto tóxico, por ejemplo, con ajustes en el ciclo celular.

d) Tabla resumen.

A continuación se exponen una tabla a modo de resumen con las principales variaciones observadas en los experimentos descritos en este apartado.

	βA_{25-35} 6h	βA_{25-35} 24h	βA_{25-35} 48h		βA_{25-35} 6h	βA_{25-35} 24h	βA_{25-35} 48h
Viabilidad	↓	↓	↓	B_{\max} unión [3H]DPCPX	↑	↑	↑
ARNm caspasa 3	↑	↑	↑	K_D unión [3H]DPCPX	≈	≈	≈
Actividad caspasa 3	≈	↑	↑	B_{\max} unión [3H]ZM241385	↑	↑	↑
B_{\max} unión L-[3H]Glu	↑	↑	↑	K_D unión [3H]ZM241385	≈	≈	≈
K_D unión L-[3H]Glu	↑	≈	↑	ARNm A_1	↑	↑	↑
Proteína mGlu ₁	↓	↓	↓	ARNm A_{2A}	↑	↑	↑
ARNm mGlu ₁	≈	≈	≈	ARNm A_{2B}	≈	≈	≈
Proteína mGlu ₅	≈	≈	≈	ARNm A_3	≈	≈	≈
Proteína mGlu _{2,3}	≈	≈	≈	ARNm CREB	↓	↑	≈
Proteína PLC β_1	≈	↓	≈	ARNm CREM	↓	↑	≈
ARNm PLC β_1	≈	≈	≈				

Tabla 33: Resumen de los resultados obtenidos en células C6 expuestas a βA_{25-35} 25 μM . En esta tabla se exponen gráficamente los resultados numéricos descritos en este capítulo. ≈, no hay variación estadística, ↑, se observa un aumento con respecto a la situación control, ↓, se observa una disminución con respecto a la situación control.

IV.5 Daño celular producido por estrés oxidativo: efecto del peróxido de hidrógeno.

IV.5.1 En cultivos primarios de neuronas de corteza.

El tejido cerebral es particularmente sensible al daño oxidativo, ello es posiblemente debido al elevado consumo de oxígeno por parte de este tejido, lo que conlleva una elevada formación de especies reactivas de oxígeno durante el proceso de fosforilación oxidativa (Castagne y col., 1999). Por este motivo se usó, durante el

desarrollo de la presente *Memoria*, el peróxido de hidrógeno como agente causante de estrés oxidativo a nivel molecular, ya que se ha demostrado su capacidad oxidativa sobre proteínas, lípidos y DNA.

a) Efecto en la viabilidad celular.

El primer paso consistió en comprobar el efecto que ejercía la exposición a H_2O_2 sobre la viabilidad celular de neuronas corticales de cerebro de rata *in vitro*. Como se observa en el panel A de la Figura 111, se empleó H_2O_2 en un rango de concentraciones variable (desde 50 hasta 500 μM) durante 30 minutos de exposición. Así se determinó que, en estas condiciones, la exposición a H_2O_2 producía muerte celular de las neuronas en cultivo de forma dependiente de la concentración, llegando en el caso más extremo a suponer una pérdida en la viabilidad de un 30% con respecto a la situación control, siendo además este caso y la exposición a H_2O_2 250 μM estadísticamente diferentes con respecto al control (50 μM : $89,51 \pm 5,23$; 100 μM : $87,66 \pm 6,89$; 250 μM : $75,49 \pm 5,33$, $p < 0,05$; 500 μM : $70,19 \pm 4,98\%$, $p < 0,05$).

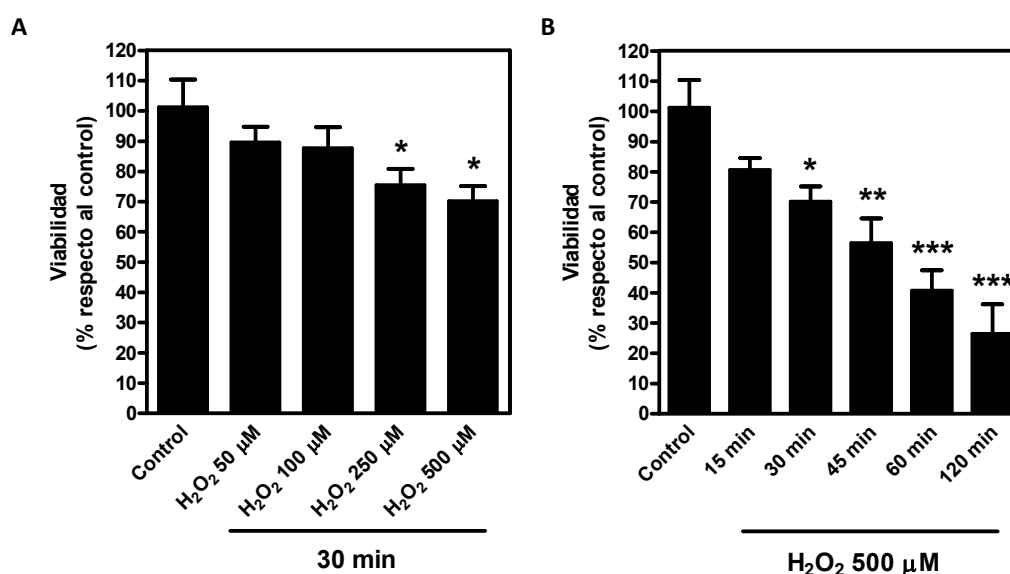


Figura 111: La exposición a H_2O_2 disminuye la viabilidad celular de forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Neuronas corticales se expusieron a distintas concentraciones de H_2O_2 durante 30 minutos (panel A) y a H_2O_2 500 μM durante 15, 30, 45, 60 y 120 minutos (panel B). Transcurrido este tiempo se midió la viabilidad celular mediante el test basado en MTT. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, expresados porcentualmente con respecto a la viabilidad de las células controles. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

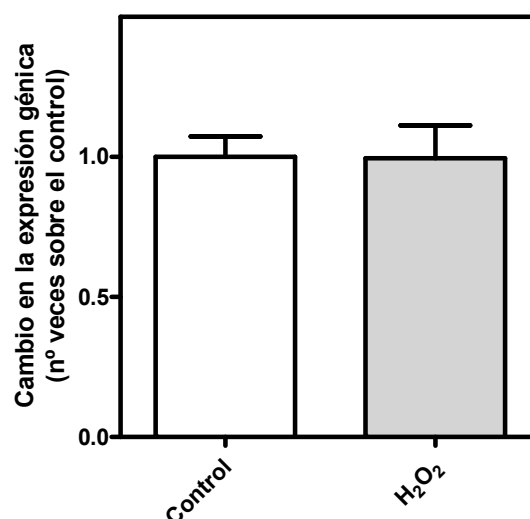
Dado que sólo se necesitaban 30 minutos de exposición para observar una disminución en la viabilidad de un 30% se amplió la exposición a H_2O_2 a lo largo del tiempo con el fin de estudiar si el efecto que se producía a lo largo del tiempo era tan dramático como el observado en los primeros 30 minutos. Los resultados obtenidos para estos experimentos se exponen en el panel B de la misma Figura. Como se aprecia, la exposición prolongada de neuronas corticales a estrés oxidativo, en estas condiciones, disminuye gradualmente la viabilidad celular conforme se prolonga el tiempo de exposición al agente tóxico. Así se aprecia, en el caso de exposición máxima estudiado, una disminución de un 74% en la viabilidad celular con

respecto a la situación control. Por otro lado, a partir de los 30 minutos de exposición todos los resultados obtenidos son significativamente diferentes con respecto a la situación control (15 min: $80,61 \pm 3,92$; 30 min: $70,19 \pm 4,99$, $p < 0,01$; 45 min: $56,45 \pm 8,13$, $p < 0,01$; 60 min: $40,79 \pm 6,67$, $p < 0,001$; 120 min: $26,46 \pm 3,99\%$, $p < 0,001$).

Estos resultados demuestran que la exposición de neuronas corticales a H_2O_2 , emulando una situación de daño oxidativo, produce una disminución gradual de la viabilidad celular dependiente tanto del tiempo como de la concentración de agente tóxico empleada, indicando la vulnerabilidad de estas células al estrés oxidativo.

De forma adicional se realizaron experimentos de RT-PCR a tiempo real con RNA aislado en condiciones control y tras la exposición a H_2O_2 500 μM durante 30 minutos, tiempo y concentración que producían una disminución de la viabilidad apreciable pero no dramática, con sondas específicas para el gen que codifica para la caspasa 3, proteasa en la que, como se ha expuesto anteriormente, convergen las rutas de muerte apoptótica. Como se aprecia en la Figura 112, no hay diferencias apreciables entre la expresión de este gen entre ambas condiciones, lo que sugiere que la muerte acontecida como consecuencia del daño oxidativo infringido a las neuronas corticales podría ocurrir vía necrosis y no vía apoptosis.

Figura 112: Efecto de la exposición a H_2O_2 sobre la expresión de caspasa 3. Neuronas corticales fueron expuestas a H_2O_2 500 μM durante 30 minutos o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando una sonda específica para el gen codificante para la caspasa 3. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras.



b) Receptores metabotrópicos de Glutamato.

Dada la relación existente entre los receptores metabotrópicos de glutamato y ciertas enfermedades con elevada incidencia sobre la población en las que se encuentra daño oxidativo a nivel celular, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer (Albasanz y col., 2005), se procedió a estudiar el papel que ejercía el estrés oxidativo sobre los receptores metabotrópicos de glutamato *in vitro*. Para ello, y en vista de los resultados previos de viabilidad, se decidió emplear en lo sucesivo el tratamiento de H_2O_2 500 μM durante 30 minutos.

Se empleó la técnica de unión de radioligandos usando L-[³H]Glu como radioligando, agente que se une a todos los receptores metabotrópicos presentes en la superficie celular. Los resultados obtenidos en estos experimentos en lo que al número de receptores y a la afinidad de los mismos se refiere, se exponen en la Figura 113. A continuación de ésta, Tabla 34, se muestran los parámetros cinéticos obtenidos en cada condición.

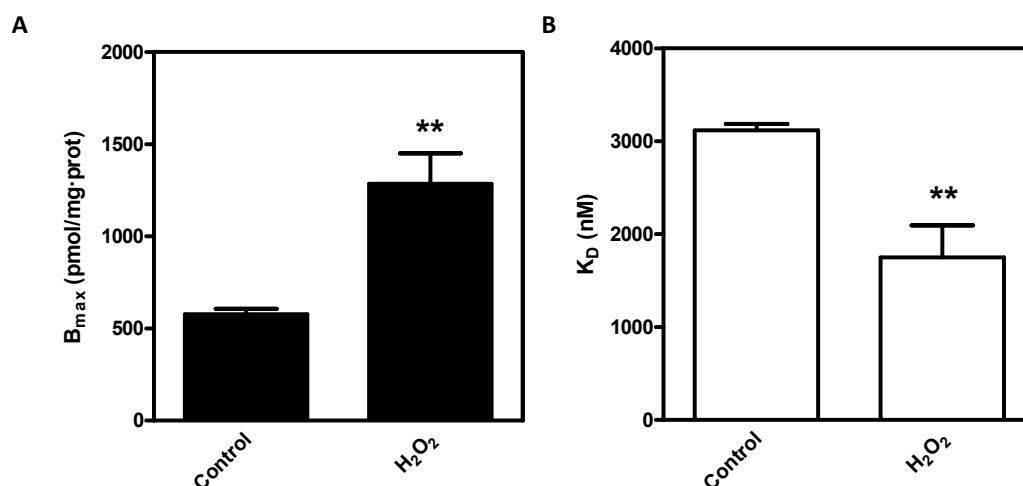


Figura 113: La exposición a H₂O₂ modula los receptores metabotrópicos en la superficie celular. Neuronas corticales se expusieron a H₂O₂ 500 μ M durante 30 minutos. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando L-[³H]Glu. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. ** p<0,01 significativamente diferente con respecto al control.

	Control	H ₂ O ₂ 500 μ M 30 min
B _{máx} (pmol/mg)	577,23 \pm 29,41	1284,80 \pm 165,58 **
K _D (nM)	3117,97 \pm 68,73	1749,58 \pm 344,59 **

Tabla 34: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de radioligandos en neuronas corticales expuestas a H₂O₂. En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. ** p<0,01 significativamente diferente respecto al correspondiente control.

Como se expone en la tabla anterior, los datos obtenidos, tanto a nivel del número de receptores como en lo que a la afinidad de los mismos por su ligando se refiere, muestran variaciones significativas entre la neuronas corticales en la situación control y tras la exposición de las mismas a H₂O₂. En concreto, el número total de receptores metabotrópicos de glutamato aumenta en un 123% mientras que la K_D de los mismos disminuye un 44%.

Estos resultados sugieren que la exposición de neuronas corticales a estrés oxidativo modula la expresión de los receptores metabotrópicos de glutamato tanto en cantidad como en afinidad.

Un estudio más detallado de la variación de los receptores metabotrópicos se llevó a cabo empleando anticuerpos extracelulares específicos para los subtipos mGlu₁, mGlu₅ y para los receptores incluidos en el grupo II (mGlu_{2,3}), de tal forma que la fijación de las células sin permeabilización posterior nos permitió realizar un seguimiento de la expresión de cada uno de los subtipos antes mencionados por inmunofluorescencia tras la exposición de las neuronas corticales a H₂O₂.

En la Figura 114, panel A, se exponen micrografías representativas de las inmunofluorescencias realizadas en situación control y tras la exposición a H₂O₂ para los anticuerpos mGlu₁, mGlu₅ y mGlu_{2,3}. En el panel B, se muestra los valores obtenidos en la cuantificación de la fluorescencia de las imágenes obtenidas en cada condición. La Tabla 35 resume las variaciones observadas.

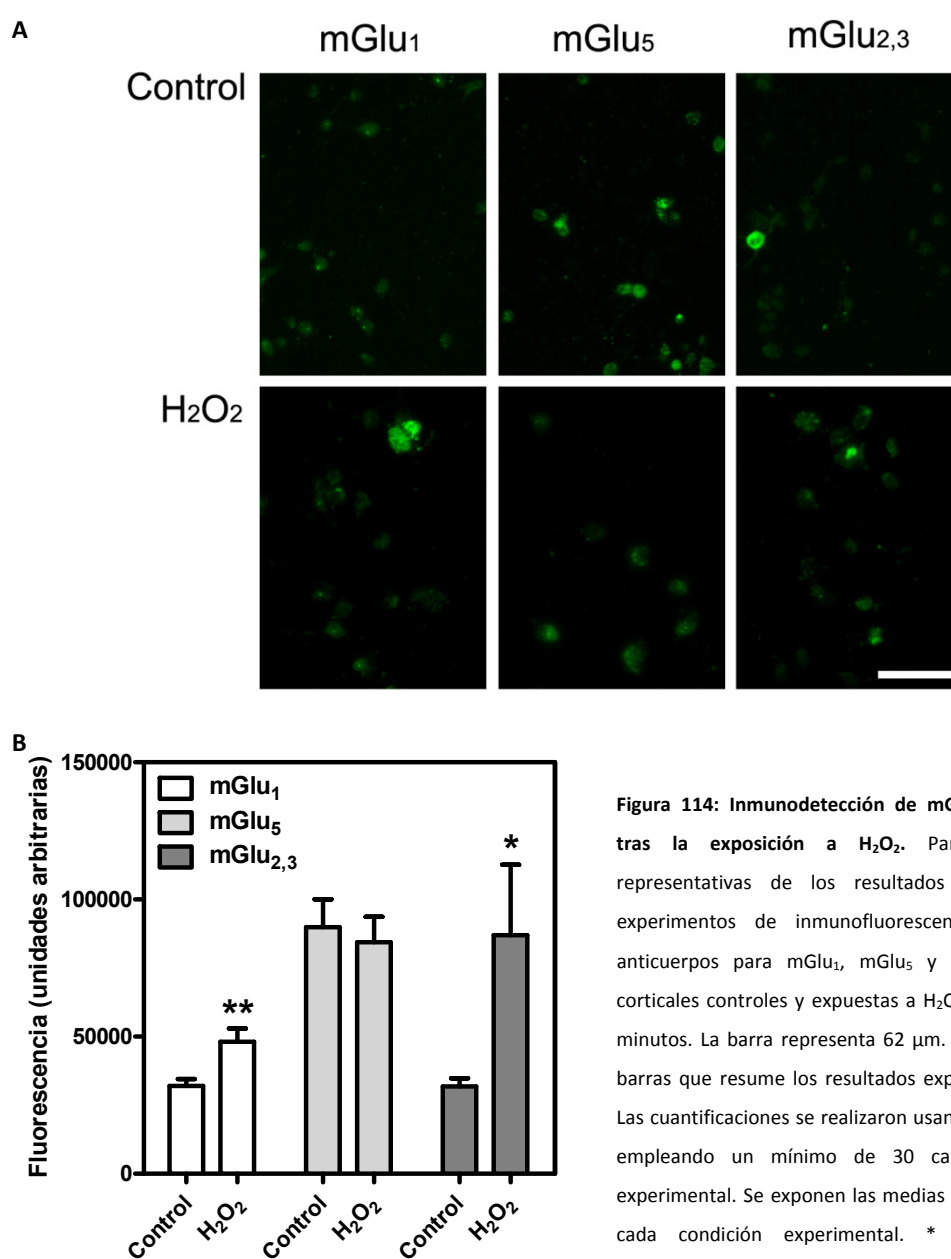


Figura 114: Inmunodetección de mGlu₁, mGlu₅ y mGlu_{2,3} tras la exposición a H₂O₂. Panel A. Micrografías representativas de los resultados obtenidos tras los experimentos de inmunofluorescencia al emplear los anticuerpos para mGlu₁, mGlu₅ y mGlu_{2,3} en neuronas corticales controles y expuestas a H₂O₂ 500 μ M durante 30 minutos. La barra representa 62 μ m. Panel B. Diagrama de barras que resume los resultados expuestos en el panel A. Las cuantificaciones se realizaron usando el *software* LAS AF empleando un mínimo de 30 campos por condición experimental. Se exponen las medias \pm SEM obtenidas para cada condición experimental. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente con respecto al control.

	mGlu ₁	mGlu ₅	mGlu _{2,3}
H ₂ O ₂ 500 µM 30 min	↑**	≈	↑*

Tabla 35: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de inmunofluorescencia en neuronas corticales expuestas a H₂O₂. Se muestra el sentido de la variación observada con respecto al correspondiente control mediante flechas: ↑ aumenta; ↓ disminuye. * p<0,05, ** p<0,01 significativamente diferente con respecto al control.

Como se aprecia en la tabla anterior la exposición a H₂O₂ modula de manera “subtipo-específica” los receptores metabotrópicos de glutamato. Se observa que los subtipos del grupo I son diferencialmente modulados, mientras que el subtipo mGlu₁ sufre un aumento porcentual de un 51% sobre su presencia en membrana en la situación control, el subtipo mGlu₅ no se ve regulado. Por otro lado, se observa que para los subtipos del grupo II también ocurre un aumento de su presencia en membrana de un 174% como consecuencia de la exposición a H₂O₂.

Existen referentes bibliográficos acerca de la relación existente entre el estrés oxidativo, la muerte celular y la liberación de calcio intracelular. Dado que se ha demostrado el incremento de mGlu₁ a nivel de la membrana plasmática y que este subtipo está acoplado a la enzima PLC, capaz de controlar la liberación de calcio del retículo endoplásmico, el siguiente paso fue comprobar si el sistema de la PLC se encontraba alterado como consecuencia de la exposición de las neuronas corticales a H₂O₂. Para ello se realizaron medidas de la actividad enzimática PLC tal y como se describe en *Métodos*.

Así, como se expone en la Figura 115, se detectó que la actividad basal de esta enzima se encontraba ligeramente alterada, en concreto los valores basales resultaban ser un 46% más elevados durante la situación de estrés oxidativo que en la situación control.

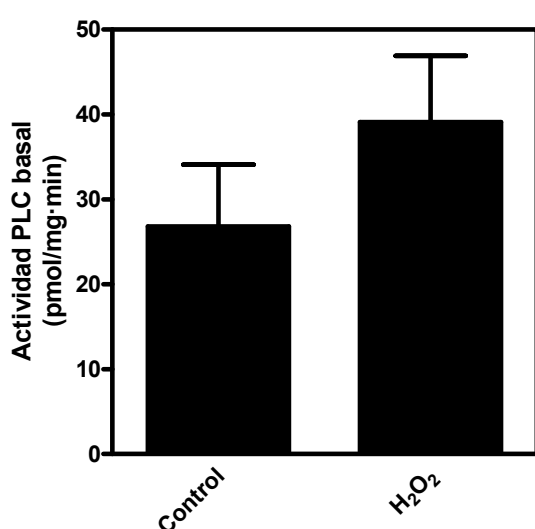


Figura 115: La exposición a H₂O₂ no afecta la actividad PLC basal. Neuronas corticales fueron expuestas o no a H₂O₂ 500 µM durante 30 minutos antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de IP₃ basal. Los datos expuestos son las medias ± SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos.

A continuación se recurrió al uso de agonistas y antagonistas específicos de los subtipos mGlu₁ y mGlu₅ con el fin de estudiar su efecto sobre el sistema de la PLC, en concreto se empleó (S)-DHPG, agonista específico de los receptores metabotrópicos del grupo I, y JNJ 16259685 y MPEP, antagonistas específicos de los subtipos mGlu₁ y mGlu₅, respectivamente.

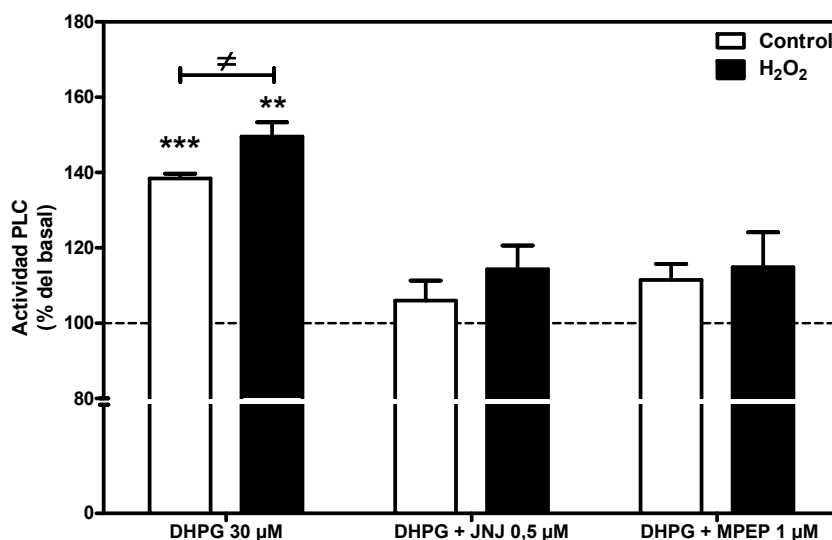


Figura 116: La exposición a H₂O₂ afecta a la funcionalidad de los receptores metabotrópicos del grupo I. Neuronas corticales fueron expuestas o no a H₂O₂ 500 μM durante 30 minutos antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de IP₃. Se estudió el efecto de la exposición a H₂O₂ sobre la funcionalidad del sistema estimulado por DHPG, agonista del grupo I de los receptores metabotrópicos de glutamato, así como el papel de los subtipos mGlu₁, inhibido por JNJ, y mGlu₅, inhibido por MPEP, en dicha funcionalidad. Los datos expuestos son las medias ± SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. ** p<0,01, *** p<0,001, significativamente diferente con respecto a su basal; ≠ p<0,05 grupos significativamente diferentes.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se exponen en la Figura 116. Como se observa, la estimulación de los receptores del grupo I produce un aumento en la cantidad de IP₃ formado en ambas situaciones, este hecho es, además, significativo estadísticamente con respecto a cada situación basal ((S)-DHPG: Control: 138,42 ± 1,26, p<0,001; H₂O₂: 149,58 ± 3,76%, p<0,01). Estos datos, además, revelan diferencias significativas cuando se comparan entre sí (p<0,05).

Cuando se emplearon los antagonistas de los subtipos mGlu₁ y mGlu₅ se observó en todos los casos una disminución en la cantidad de IP₃ formado. Sin embargo estos resultados no presentaban diferencias significativas entre sí ((S)-DHPG + JNJ: Control: 105,98 ± 5,33; H₂O₂: 114,33 ± 6,28%. (S)-DHPG + MPEP: Control: 111,44 ± 4,30; H₂O₂: 114,89 ± 9,28%).

De estos experimentos se deduce que aparentemente la actividad basal es mayor en neuronas corticales expuestas a H₂O₂, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, y que la capacidad del grupo I de receptores metabotrópicos de estimular el sistema de la PLC es, en estas condiciones, también mayor, presumiblemente por causa del incremento en la cantidad de mGlu₁ en la membrana plasmática. Sin embargo, los experimentos de inhibición de la estimulación PLC por empleo de antagonistas específicos de los subtipos

mGlu₁ y mGlu₅ no arrojaron luz sobre el papel de cada subtipo en la estimulación de la PLC en ambas condiciones.

Una vez comprobado el efecto de la exposición a H₂O₂ sobre la cantidad de receptores en la superficie celular y su capacidad de estimulación del sistema de la PLC, se procedió a comprobar si los componentes del sistema estudiado sufrían cambios a nivel de la expresión génica. Para ello se realizaron ensayos de RT-PCR a tiempo real en los que se emplearon sondas específicas para los genes que codifican para las proteínas mGlu₁, mGlu₅ y PLCβ₁. Como se expone en la Figura 117, la exposición a H₂O₂ produce una disminución significativa en el caso de los genes codificantes para mGlu₁ y PLCβ₁. En concreto se cuantificó una disminución de un 37% (p<0,05) y de un 26% (p<0,05), respectivamente. Sin embargo la expresión génica de mGlu₅ no se veía alterada como consecuencia de la exposición de neuronas corticales a H₂O₂.

Estos resultados apuntan a que las variaciones observadas a nivel de la cantidad de proteína de mGlu₁ de la actividad PLC tras las exposiciones a H₂O₂, no pueden ser explicadas por cambios en la expresión génica de mGlu₁ ni de PLCβ₁.

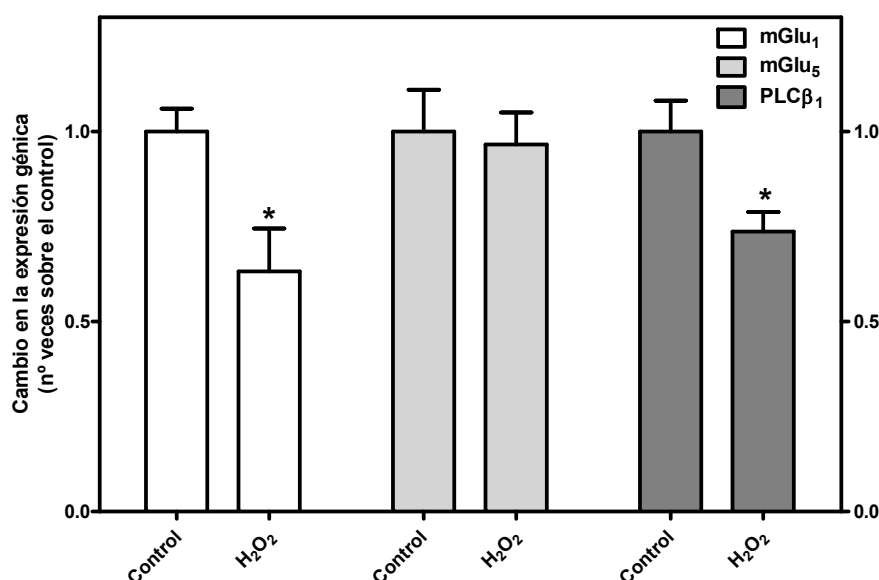
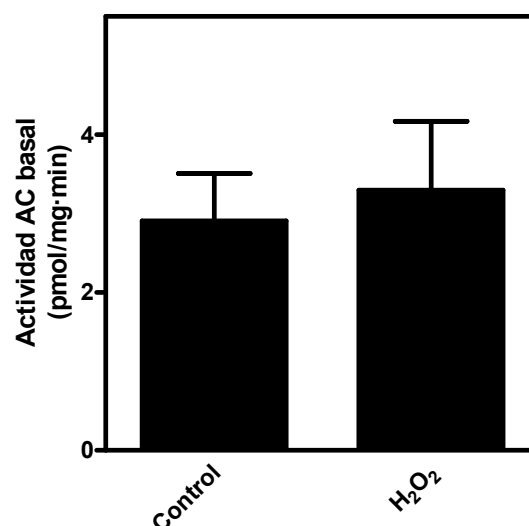


Figura 117: Efecto de la exposición a H₂O₂ sobre la expresión génica de mGlu₁, mGlu₅ y PLCβ₁. Neuronas corticales fueron expuestas a H₂O₂ 500 μM durante 30 minutos o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias ± SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * p<0,05 significativamente diferente con respecto al control.

Con el fin de completar el estudio del efecto que ejercía la exposición de neuronas corticales a H₂O₂ *in vitro* sobre los receptores metabotrópicos, se analizó la vía principal a la que están acoplados los grupos II y III de estos receptores, la inhibición de la adenilato ciclasa, controlando, de esta manera, los niveles del segundo mensajero AMPc. El estudio de la actividad basal de la AC, expuesto en la Figura 118, desvela que la exposición a H₂O₂ no produce cambios significativos dicha actividad.

Figura 118: Efecto de la exposición a H_2O_2 sobre la actividad AC basal. Neuronas corticales fueron expuestas o no a H_2O_2 500 μ M durante 30 minutos antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de AMPc basal. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos.



En la Figura 119 se estudió el efecto que ejercían agonistas específicos de los grupos II y III de los receptores metabotrópicos de glutamato sobre la actividad AC estimulada directamente con Forskolina. Para ello, se emplearon los ligandos (2R, 4R)-APDC, agonista del grupo II, y L-AP4, agonista del grupo III. Como se observa en el panel A de la mencionada Figura, el empleo de (2R, 4R)-APDC en neuronas expuestas a estrés oxidativo proporciona una inhibición mayor de la actividad AC previamente estimulada con forskolina (% inhibición: Control: 42,76 \pm 5,60; H_2O_2 : 67,63 \pm 4,34), la cual resultaba significativa desde un punto de vista estadístico ($p < 0,05$).

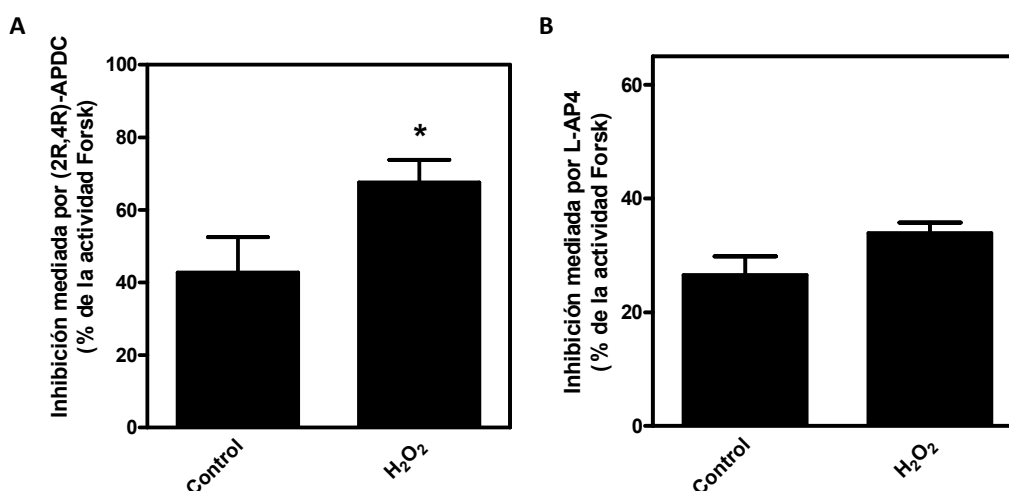


Figura 119: Efecto de la exposición a H_2O_2 sobre la actividad AC mediada por los receptores mGlu. Neuronas corticales fueron expuestas o no a H_2O_2 500 μ M durante 30 minutos antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de AMPc. Se estudió el efecto de la exposición a H_2O_2 sobre la funcionalidad del sistema inhibido por un agonista del grupo II de los receptores metabotrópicos de glutamato, (2R,4R)-APDC 100 μ M (panel A), y por un agonista del grupo III, L-AP4 100 μ M (panel B). Los resultados se expresan como el tanto por ciento de la inhibición observada sobre la estimulación de forskolina 100 nM (Forsk). Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. * $p < 0,05$ significativamente diferente de su correspondiente control.

Por otro lado, en el panel B de la mencionada figura se exponen los resultados obtenidos al activar los receptores del grupo III empleando el ligando L-AP4. Como se observa, los datos de la inhibición obtenida en ambos grupos experimentales sobre la actividad AC previamente estimulada, demuestran que no existen diferencias significativas en la capacidad de L-AP4 de inhibir la AC (% inhibición: Control: $26,53 \pm 3,29$; H_2O_2 : $33,92 \pm 1,84$).

Por tanto, tomando estos resultados en su conjunto se puede afirmar que la vía de la AC resulta afectada en la situación de estrés oxidativo sólo en el caso de los receptores metabotrópicos del grupo II, observándose una potenciación de esta vía de inhibición.

c) Receptores de adenosina.

Al igual que los receptores metabotrópicos de glutamato, los receptores de adenosina se han visto relacionados recientemente con determinadas enfermedades neurodegenerativas. Por este motivo el estudio del efecto del estrés oxidativo *in vitro* se amplió a los receptores de adenosina y su vía de transducción principal, la enzima adenilato ciclasa.

El primer paso fue cuantificar si existía variación entre los receptores de adenosina a nivel de la superficie celular como consecuencia de la exposición de neuronas corticales a H_2O_2 , para ello se empleó la técnica de unión de radioligandos. En el caso del receptor A_1 se empleó el antagonista tritiado [3H]DPCPX, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 120. Un resumen de estos experimentos se muestra en la Tabla 36.

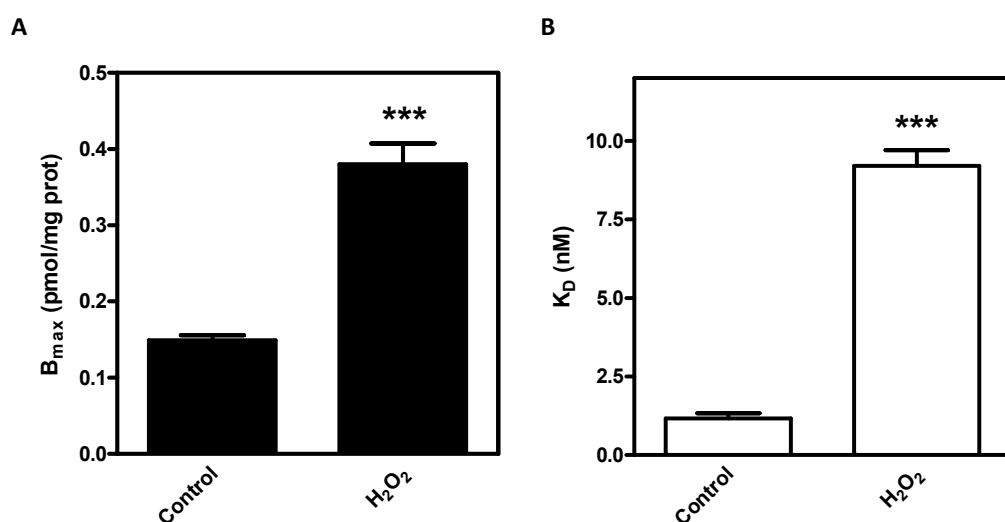


Figura 120: La exposición a H_2O_2 modula los receptores A_1 en la superficie celular. Neuronas corticales se expusieron a H_2O_2 500 μM durante 30 minutos. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [3H]DPCPX. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto al control.

	Control	H ₂ O ₂ 500 μ M 30 min
B_{máx} (pmol/mg)	0,149 \pm 0,007	0,380 \pm 0,027 ***
K_D (nM)	1,16 \pm 0,16	9,21 \pm 0,50 ***

Tabla 36: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [³H]DPCPX en neuronas corticales expuestas a H₂O₂. En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. *** p<0,001 significativamente diferente respecto al correspondiente control.

Como se expone en la Tabla 36, la exposición de neuronas corticales a H₂O₂ modulaba tanto la cantidad como la afinidad de los receptores A₁ en la superficie celular. Se aprecia que el número total de receptores A₁ en condiciones de estrés oxidativo aumenta en un 155% (p<0,001). Además, en estas condiciones los receptores sufrían una disminución muy marcada en la afinidad que demuestran por su ligando, en concreto el valor de K_D observado tras la exposición a H₂O₂ es 7,9 veces mayor que el observado en condiciones controles (p<0,001).

Por otro lado, para el estudio de los receptores A_{2A} de adenosina se empleó el antagonista [³H]ZM241385 en los ensayos de unión de radioligandos, como se expone en la Figura 121. Los resultados obtenidos en estos experimentos se resumen en la Tabla 37.

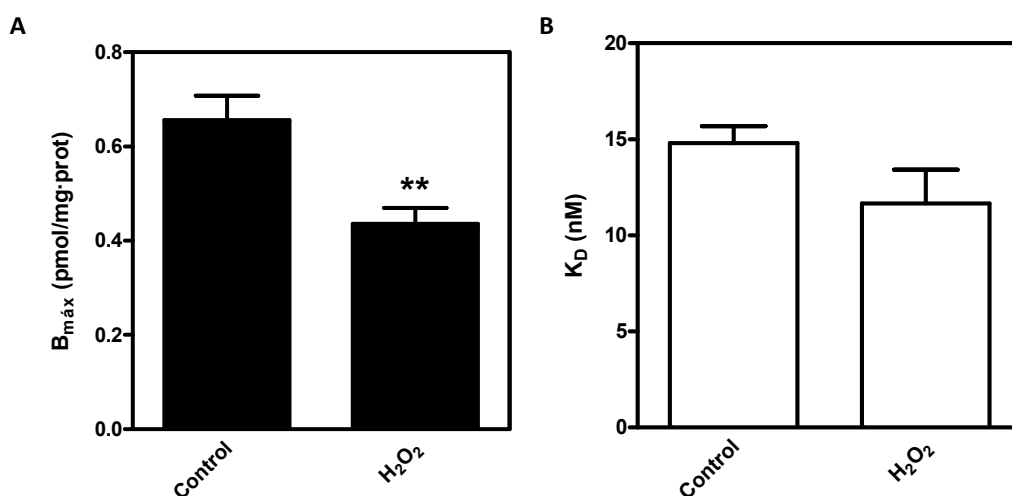


Figura 121: La exposición a H₂O₂ modula los receptores A_{2A} en la superficie celular. Neuronas corticales se expusieron a H₂O₂ 500 μ M durante 30 minutos. Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [³H]ZM241385. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes cultivos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{máx} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. ** p<0,01 significativamente diferente con respecto al control.

	Control	H ₂ O ₂ 500 µM 30 min
B_{máx} (pmol/mg)	0,656 ± 0,051	0,436 ± 0,033 **
K_D (nM)	13,26 ± 0,26	11,66 ± 1,76

Tabla 37: Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de unión de [³H]ZM241385 en neuronas corticales expuestas a H₂O₂.

En esta tabla se exponen los resultados numéricos obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos. ** p<0,01 significativamente diferente respecto al correspondiente control.

Como se ha expuesto en la Tabla 37, de nuevo, la exposición a H₂O₂ en neuronas corticales modula un receptor acoplado a proteína G a nivel de membrana plasmática, en este caso el receptor A_{2A} disminuye su presencia en la membrana plasmática en un 34% como consecuencia del estrés oxidativo (p<0,01) sin que ello afecte a la afinidad por su ligando.

Estos resultados, tomados en conjunto, indican que la exposición a H₂O₂ modula la presencia de los receptores de adenosina a nivel de la membrana celular aumentando, en el caso del receptor A₁, o disminuyendo, en el caso de A_{2A}. Además de comprobar que el estrés oxidativo modula de forma opuesta los receptores de adenosina A₁ y A_{2A} se ha demostrado que esta regulación no ocurre sólo a nivel de la cantidad de receptor, sino que también es específica para la afinidad de los mismos por su ligando, así la afinidad de los receptores A₁ por su ligando disminuye mientras que la de los A_{2A} no resulta afectada en este proceso.

Una vez cuantificados los cambios en la cantidad de proteína, se procedió a comprobar si la exposición de neuronas corticales a H₂O₂ modulaba la expresión génica de los receptores de adenosina. Para ello, se realizaron ensayos de RT-PCR con sondas específicas para los genes que codifican para los receptores A₁, A_{2A} y A_{2B} (Figura 122).

Como se observa, tanto para los genes que codifican para los receptores A₁ como A_{2A} no se observan variaciones en la cantidad de ARNm detectado, aunque se observa una cierta tendencia ascendente. Por otro lado, cuando se estudió el receptor A_{2B} se detectó un aumento muy relevante de la cantidad de ARNm correspondiente a este receptor tras la exposición a H₂O₂, en concreto la cantidad de ARNm aumentaba en 3,2 veces con respecto al control (p<0,05).

Por tanto, estos resultados apuntan a que existe modulación de la expresión génica del receptor A_{2B}, el cual aumenta su expresión como consecuencia de la exposición de neuronas corticales a H₂O₂. Sin embargo, en el caso de los receptores A₁ y A_{2A} no parece existir modulación de su expresión génica.

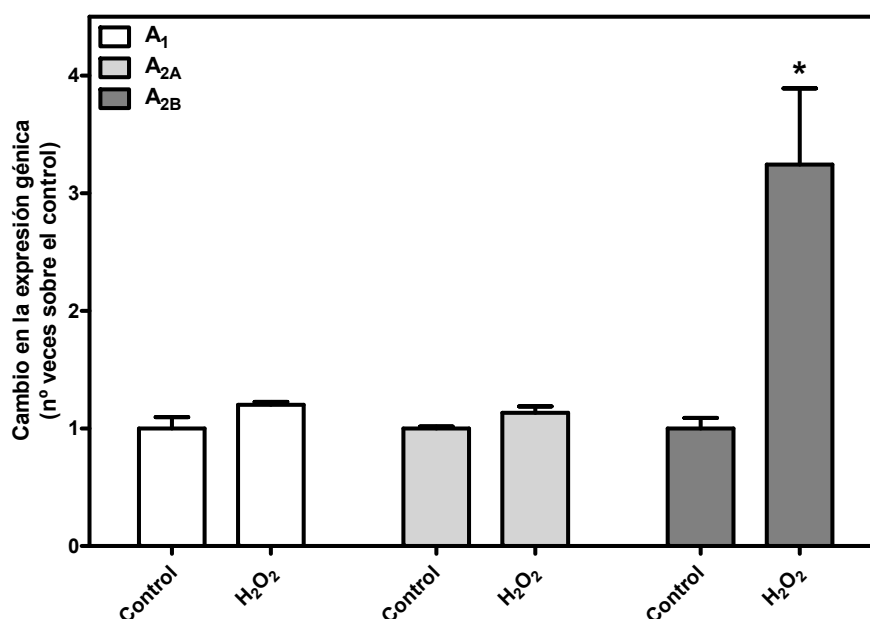


Figura 122: Efecto de la exposición a H₂O₂ sobre la expresión génica de A₁, A_{2A} y A_{2B}. Neuronas corticales fueron expuestas a H₂O₂ 500 μ M durante 30 minutos o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$ significativamente diferente con respecto al control.

Además se planteó el estudio de la principal vía de transducción a la que están acoplados los receptores de adenosina, la modulación de la actividad AC. Una vez más, se cuantificó la cantidad de AMPc en neuronas corticales expuestas o no a estrés oxidativo, como se expone en la Figura 123. Se observó (panel A) que la capacidad del ligando CHA de inhibir la actividad AC previamente estimulada con forskolina aumentaba en neuronas corticales sometidas a estrés oxidativo, es decir aumentaba la capacidad del sistema de transducción del receptor A₁ (% inhibición: Control: $24,95 \pm 2,89$; H₂O₂: $40,11 \pm 1,84$, $p < 0,01$).

Sin embargo, en el caso del receptor A_{2A}, panel B, lo que se observaba era que los receptores A_{2A} presentaban una menor capacidad de transducción de la señal, ya que al ser estimulados con CGS 21680 se observaba una cantidad significativamente menor de AMPc formado con respecto a la situación control (% estimulación: Control: $174,33 \pm 3,64$; H₂O₂: $143,64 \pm 1,06$, $p < 0,01$).

Estos resultados revelan que, como consecuencia del estrés oxidativo al que se sometió a las neuronas corticales de cerebro de rata *in vitro*, la vía de transducción de señales mediada por los receptores de adenosina resultó alterada, modificándose la capacidad de los receptores A₁ y A_{2A} para controlar las variaciones en los niveles del segundo mensajero AMPc en el mismo sentido en que varían dichos receptores.

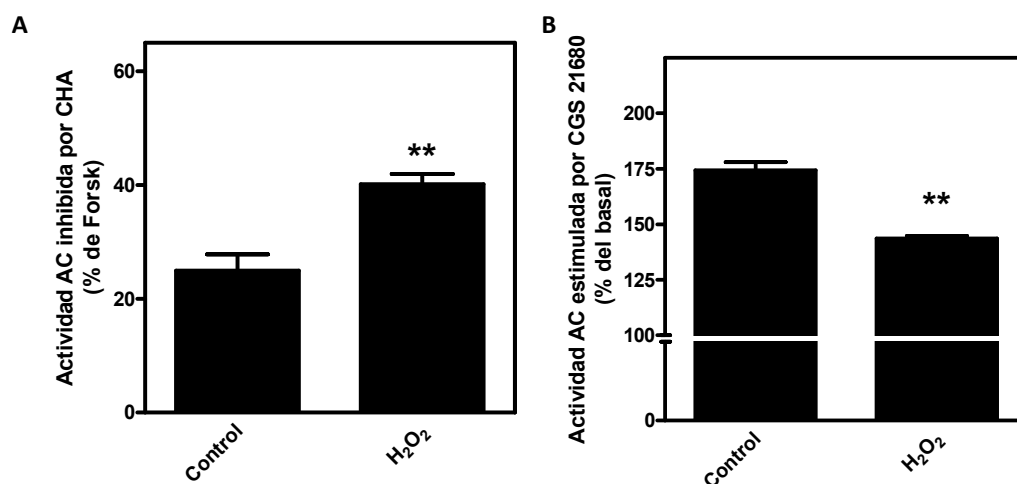


Figura 123: Efecto de la exposición a H_2O_2 sobre la actividad AC mediada por los receptores de adenosina. Neuronas corticales fueron expuestas o no a H_2O_2 500 μ M durante 30 minutos antes de realizar los ensayos enzimáticos para la acumulación de AMPc. Se estudió el efecto de la exposición a H_2O_2 sobre la inhibición de la actividad AC por el receptor A_1 (panel A), empleando el agonista específico CHA a 1 μ M para inhibir la actividad estimulada por forskolina 100 nM (Forsk). También se comprobó la estimulación de la actividad AC promovida por el receptor A_{2A} (panel B), para lo cual se empleó el agonista específico CGS 21680 a 1 μ M. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos cultivos. ** $p < 0,01$ significativamente diferente de su correspondiente control. Actividad basal: Control: 2.91 ± 0.60 ; Tratada: 3.30 ± 0.87 pmol/mg·min.

El último apartado de este estudio comprendió el análisis por RT-PCR a tiempo real de las posibles variaciones que surgieran en los factores de transcripción CREB y CREM, relacionados ambos con la vía del AMPc. Como se expone en la Figura 124, se produce una disminución de la expresión génica de ambos factores de transcripción constitutivos. En el caso del gen que codifica para CREB se detectó una disminución de un 26% en la cantidad de ARNm detectado, mientras que fue de un 36% en el caso de su modulador CREM. En ambos casos los resultados obtenidos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente).

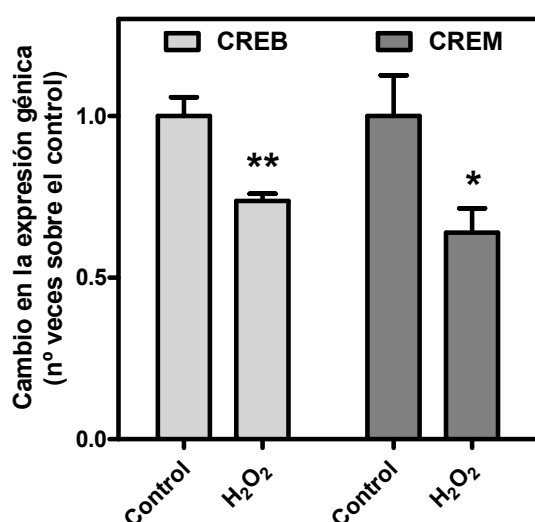


Figura 124: Efecto de la exposición a H_2O_2 sobre la expresión génica de los factores CREB y CREM. Neuronas corticales fueron expuestas a H_2O_2 500 μ M durante 30 minutos o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes codificantes para los factores de transcripción mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente con respecto al control.

Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que los procesos de transducción de señales que se producen como consecuencia de un aumento en la cantidad del segundo mensajero AMPc ocurren en menor

medida en condiciones de estrés oxidativo en neuronas corticales por dos motivos, la enzima AC presenta una capacidad de ser estimulada menor y una capacidad de ser inhibida mayor y, por otro lado, factores de transcripción modulado por AMPc (CREB y CREM) disminuyen su expresión en estas condiciones.

d) Tabla resumen.

A continuación se exponen una tabla a modo de resumen con las principales variaciones observadas en los experimentos descritos en este apartado.

	H ₂ O ₂ 500μM 0,5h		H ₂ O ₂ 500μM 0,5h	
Viabilidad	↓	Actividad AC basal	≈	
ARNm caspasa 3	≈	Actividad AC Grupo II	↑	
B _{max} unión L-[³ H]Glu	↑	Actividad AC Grupo III	≈	
K _D unión L-[³ H]Glu	↓	B _{max} unión [³ H]DPCPX	↑	
Proteína mGlu ₁	↑	K _D unión [³ H]DPCPX	↑	
ARNm mGlu ₁	↓	B _{max} unión [³ H]ZM241385	↓	
Proteína mGlu ₅	≈	K _D unión [³ H]ZM241385	≈	
ARNm mGlu ₅	≈	ARNm A ₁	≈	
Proteína mGlu _{2,3}	↑	ARNm A _{2A}	≈	
ARNm PLCβ ₁	↓	ARNm A _{2B}	↑	
Actividad PLC basal	≈	Actividad A ₁ /AC	↑	
Actividad PLC Grupo I	↑	Actividad A _{2A} /AC	↓	
		ARNm CREB	↓	
		ARNm CREM	↓	

Tabla 38: Resumen de los resultados obtenidos en neuronas corticales expuestas a H₂O₂. En esta tabla se exponen gráficamente los resultados numéricos descritos en este capítulo. ≈, no hay variación estadística, ↑, se observa un aumento con respecto a la situación control, ↓, se observa una disminución con respecto a la situación control.

IV.5.2 En células C6 de glioma de rata.

Como se ha comentado en apartados anteriores el tejido cerebral es particularmente sensible al daño oxidativo inducido por las especies reactivas de oxígeno. Por ello, se amplió el estudio del daño inducido por la exposición a H₂O₂ al modelo celular de células C6 de glioma de rata, modelo que, dependiendo de factores como las condiciones de cultivo, posee propiedades oligodendrocíticas, astrocíticas o neuronales (Parker y col., 1980).

a) Efecto en la viabilidad celular.

El primer paso de este estudio fue comprobar si el efecto tóxico de la exposición a H_2O_2 descrito en las neuronas corticales se reproducía en el modelo de C6. Los resultados obtenidos para estos experimentos se exponen en la Figura 125. En el panel A se muestra el efecto que ejercía sobre la viabilidad celular la exposición a distintas concentraciones de H_2O_2 durante 30 minutos. Como se observa, sólo la exposición a H_2O_2 500 μM produjo una disminución de la viabilidad celular significativa de un 16% con respecto al control, como ocurría en neuronas corticales (Control: $100,00 \pm 5,54$; H_2O_2 500 μM 30': $84,27 \pm 1,64\%$, $p < 0,05$).

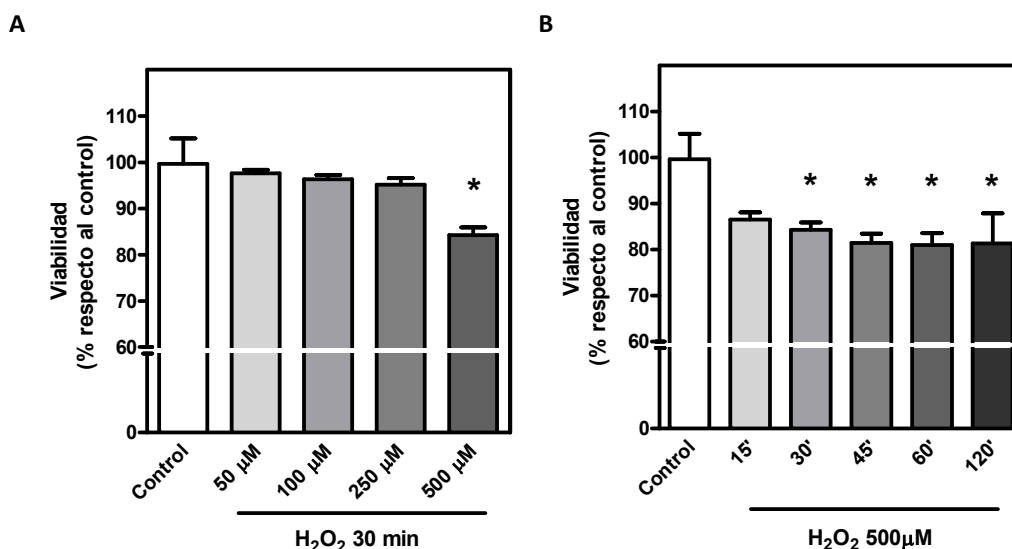


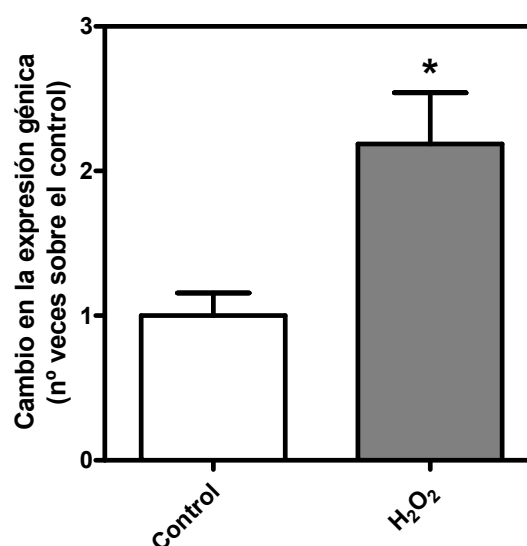
Figura 125: La exposición a H_2O_2 disminuye la viabilidad celular. Células C6 se expusieron a distintas concentraciones de H_2O_2 durante 30 minutos (panel A) y a H_2O_2 500 μM durante 15, 30, 45, 60 y 120 minutos (panel B). Transcurrido este tiempo se midió la viabilidad celular mediante el test basado en MTT. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, expresados porcentualmente con respecto a la viabilidad de las células controles. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferente con respecto al control; ns no significativo.

Un estudio del daño producido por la exposición a H_2O_2 a lo largo del tiempo se presenta en el panel B. Para ello se empleó la concentración de 500 μM , la cual se ha demostrado que producía muerte celular a los 30 minutos de exposición. Como se observa en dicho panel, el daño producido sobre las células C6 como consecuencia de la exposición a H_2O_2 comienza a ser significativo a partir de los 30 minutos de exposición, aunque a los 15 minutos ya se observa una disminución de la viabilidad. Sin embargo éste no aumenta si se prolonga el tiempo de exposición hasta los 120 minutos, es decir, el efecto tóxico de la exposición a H_2O_2 ocurre en los 30 minutos primeros de exposición (Control: $99,62 \pm 5,54$; 15': $86,51 \pm 1,56$; 30': $84,27 \pm 1,64$, $p < 0,05$; 45': $81,43 \pm 2,04$, $p < 0,05$; 60': $80,98 \pm 2,55$, $p < 0,05$; 120': $81,30 \pm 3,28\%$, $p < 0,05$). El análisis estadístico de los datos obtenidos a lo largo de los tiempos de exposición demuestran que no existe variación significativa entre la disminución de la viabilidad descrita a 30 minutos de exposición a H_2O_2 500 μM y las observadas a 45, 60 y 120 minutos de exposición.

Estos resultados indican que la exposición a H_2O_2 produce una disminución de la viabilidad a una concentración de 500 μM , con la particularidad de que el daño producido sobre las células C6 no aumenta si se prolonga el tiempo de exposición a este agente tóxico desde los 30 minutos de exposición hasta un máximo de dos horas.

Dado que existen antecedentes bibliográficos que proponen que el daño oxidativo en células C6 produce muerte celular mediada por la vía de las caspasas (Marangolo y col., 2001) y con el fin de validar el modelo experimental de daño oxidativo empleado (la exposición de C6 a H_2O_2 500 μM durante 30 minutos) se comprobó si la exposición de estas células a H_2O_2 producía un aumento de la expresión génica del gen que codifica para la caspasa 3. Para ello, se aisló RNA total de células C6, en condiciones controles y tras la exposición de estas células a H_2O_2 , y se empleó en experimentos de RT-PCR a tiempo real. Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 126. Como se observa, la exposición a H_2O_2 en estas condiciones produce un aumento en la expresión génica de la caspasa 3, este aumento porcentualmente se corresponde con un incremento de un 119% en la expresión de su ARNm con respecto a la situación control. Por otro lado, este aumento resulta significativo según el test estadístico empleado ($p < 0,05$).

Figura 126: Efecto de la exposición a H_2O_2 sobre la actividad de caspasa 3. Células C6 fueron expuestas a H_2O_2 500 μM durante 30 minutos o se mantuvieron en condiciones control. Posteriormente se realizaron ensayos de actividad enzimática específicos de caspasa 3 empleando el kit comercial descrito en *Métodos*. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos pases. * $p < 0,05$ significativamente diferente con respecto a la actividad control.



Estos resultados sugieren que el modelo de daño oxidativo empleado es válido puesto que se ajusta a dos hechos básicos recogidos en la bibliografía para el daño producido por H_2O_2 : la exposición a H_2O_2 disminuye la viabilidad celular y lo hace activando la vía de las caspasas.

b) Receptores metabotrópicos de Glutamato.

Debido a la variación de los receptores metabotrópicos de glutamato en algunas enfermedades neurodegenerativas que cursan con aumento de las especies reactivas de oxígeno, se estudió si la exposición a H_2O_2 en células C6 de glioma de rata ejercía algún efecto sobre la cantidad de estos receptores en la membrana plasmática. Para ello, se aislaron membranas plasmáticas de las células C6 en condiciones normales y tras ser expuestas durante 30 minutos a la presencia de H_2O_2 500 μM . Estas membranas fueron separadas

electroforéticamente para ser después inmovilizadas en membranas de nitrocelulosa, las cuales se incubaron con anticuerpos específicos para los subtipos 1 y 5 y con anticuerpos específicos para los receptores metabotrópicos del grupo II (subtipos 2 y 3). Así en la Figura 127 se muestran los resultados obtenidos para estos experimentos de *Western blot*.

Como se observa en el panel A, para el receptor mGlu₁ se observa un aumento de un 32% en la cantidad total de proteína en membrana ($p<0,05$). Para mGlu₅ el análisis densitométrico demuestra que ocurre una disminución significativa de un 32% en la cantidad de esta proteína presente en la membrana plasmática tras la exposición a este agente tóxico ($p<0,01$). Por último, en el panel C se exponen los datos obtenidos para el caso de los receptores metabotrópicos del grupo II, para los cuales se empleó un anticuerpo capaz de detectar tanto el subtipo 2 como el subtipo 3 de dichos receptores. Tal y como se expone, se observa un aumento de un 22% de este grupo de receptores tras la exposición a H₂O₂. Sin embargo, este aumento no resulta ser significativo cuando es sometido a un análisis estadístico ($p=0,104$).

Estos resultados indican que la exposición a H₂O₂ 500 μ M durante 30 minutos es suficiente para modular la presencia de algunos de los receptores metabotrópicos siendo esta modulación además específica para cada subtipo. Así, para los subtipos incluidos dentro del grupo I la exposición a H₂O₂ produce efectos antagónicos, mientras que aumenta la presencia en membrana plasmática del subtipo mGlu₁, disminuye la del subtipo mGlu₅. Sin embargo, debido a que el anticuerpo empleado en el caso del grupo II es sensible a las formas mGlu₂ y mGlu₃, no es posible especificar si las variaciones que ocurren dentro de este grupo, aun no siendo significativas en su conjunto, son específicas de cada subtipo del receptor. Debido a las variaciones tan específicas que se describieron para los subtipos del grupo I, el siguiente paso fue comprobar si el principal sistema al que está acoplado el grupo I de receptores metabotrópicos de glutamato se veía también alterado como consecuencia de la exposición a H₂O₂ en células C6 de glioma de rata. Para ello se siguió empleando la técnica de *Western blot* usando anticuerpos específicos contra la isoforma β_1 de la proteína PLC.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se exponen en la Figura 128. En el panel superior se muestran imágenes de blots representativos de los obtenidos, mientras que en la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de los resultados obtenidos así como el análisis estadístico de los mismos. Como se observa, la exposición a H₂O₂ produce un aumento significativo en la cantidad total de proteína PLC β_1 de casi tres veces con respecto a la situación control ($p<0,05$).

Estos resultados sugieren que la principal vía de transducción a la que están acoplados los receptores metabotrópicos del grupo I se ve alterada como consecuencia de exposición a H₂O₂.

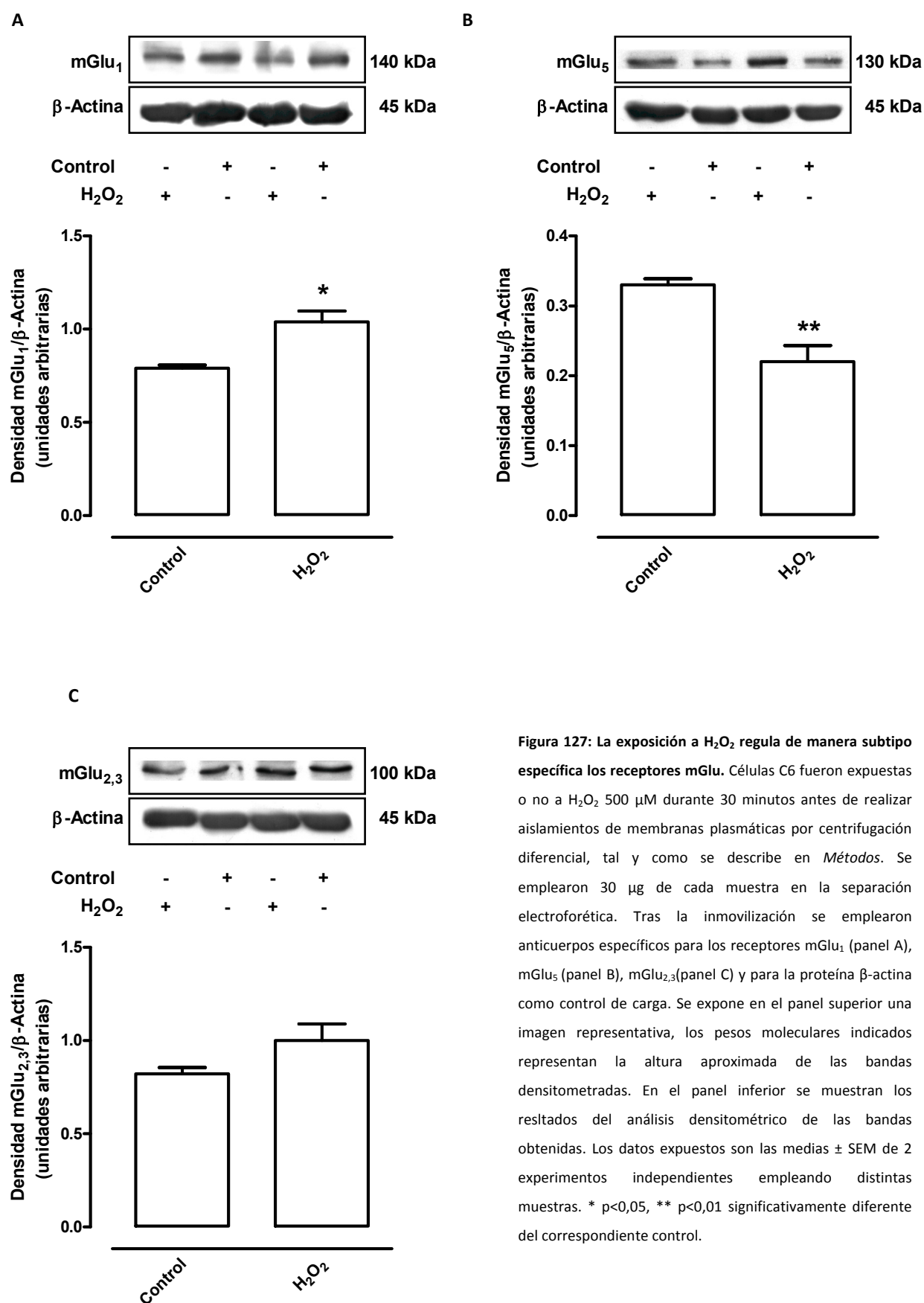


Figura 127: La exposición a H₂O₂ regula de manera subtipo específica los receptores mGlu. Células C6 fueron expuestas o no a H₂O₂ 500 μM durante 30 minutos antes de realizar aislamientos de membranas plasmáticas por centrifugación diferencial, tal y como se describe en *Métodos*. Se emplearon 30 μg de cada muestra en la separación electroforética. Tras la inmovilización se emplearon anticuerpos específicos para los receptores mGlu₁ (panel A), mGlu₅ (panel B), mGlu_{2,3} (panel C) y para la proteína β-actina como control de carga. Se expone en el panel superior una imagen representativa, los pesos moleculares indicados representan la altura aproximada de las bandas densitometradas. En el panel inferior se muestran los resultados del análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Los datos expuestos son las medias ± SEM de 2 experimentos independientes empleando distintas muestras. * p<0,05, ** p<0,01 significativamente diferente del correspondiente control.

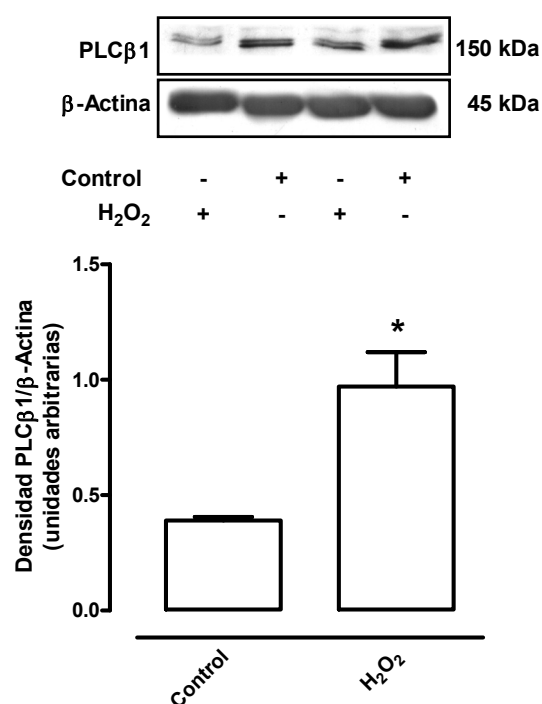


Figura 128: La exposición a H₂O₂ regula al alza la proteína PLCβ₁. Células C6 fueron expuestas o no a H₂O₂ 500 μM durante 30 minutos antes de realizar aislamientos de membranas plasmáticas por centrifugación diferencial, tal y como se describe en *Métodos*. Se emplearon 30 μg de cada muestra en la separación electroforética. Tras la inmovilización se emplearon anticuerpos específicos para PLCβ₁ y para la proteína β-actina como control de carga. Se expone en el panel superior una imagen representativa, los pesos moleculares indicados representan la altura aproximada de las bandas densitometradas. En el panel inferior se muestran los resultados del análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Los datos expuestos son las medias ± SEM de 2 experimentos independientes empleando distintas muestras. * p<0,05 significativamente diferente del correspondiente control.

Por último, se comprobó si las diferencias observadas en los componentes del sistema de estudio a nivel de la cantidad de proteína en la membrana plasmática procedían de la regulación de la expresión génica de los genes correspondientes como consecuencia de la presencia del H₂O₂ en el medio. Para ello se realizaron ensayos de PCR a tiempo real empleando sondas específicas para los genes que codifican para el receptor mGlu₁ y para la enzima PLCβ₁.

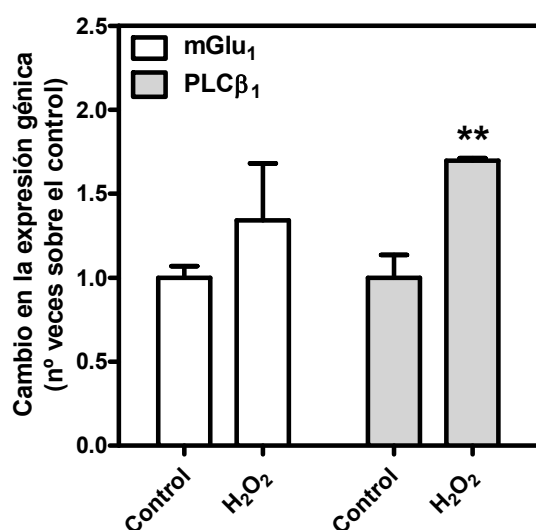


Figura 129: Efecto de la exposición a H₂O₂ sobre la expresión génica de mGlu₁ y PLCβ₁. Células C6 fueron expuestas a H₂O₂ 500 μM durante 30 minutos o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias ± SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. ** p<0,01, significativamente diferente con respecto al control.

Los resultados obtenidos para estos experimentos se exponen en la Figura 129. Como se observa, la exposición a H₂O₂ no produce variaciones en la cantidad de ARNm detectado para el receptor mGlu₁. Por otro lado, en el caso de la enzima PLCβ₁ se observa un aumento en su expresión génica de un 70% (p<0,01).

Estos resultados apuntan a que mientras que el aumento detectado en la enzima PLCβ₁ a nivel de proteína puede ser consecuencia del aumento detectado a nivel de ARNm, en el caso del receptor mGlu₁ el

aumento observado a nivel de proteína puede no ser debido al aumento en la expresión génica sino que podría ser atribuido a mecanismos post-transcripcionales adicionales que fomentaran el aumento del receptor mGlu₁ a nivel de proteína en la membrana plasmática.

c) Receptores de adenosina.

En la actualidad todavía es controvertido el papel que juegan los receptores de adenosina en determinadas enfermedades neurodegenerativas. Es sabido que, la patogénesis de algunas de ellas cursa con un aumento de la producción de radicales libres. Por este motivo se procedió a estudiar la modulación que sufrían esta familia de receptores como consecuencia de la exposición de las células C6 de glioma de rata a H₂O₂, en las condiciones experimentales ya expuestas en apartados anteriores. Para ello se empleó la técnica de *Western blot*, por lo que se aisló por centrifugación diferencial la fracción correspondiente a la proteína de membrana plasmática de células C6 en condiciones control y tras la exposición a H₂O₂ durante 30 minutos.

Estas fracciones se emplearon en experimentos de *Western blot*, tal y como se expuso en *Métodos*, usando los anticuerpos específicos disponibles para los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}. Los resultados obtenidos en estos experimentos se exponen en la Figura 130. En la parte superior de los paneles A y B se muestran imágenes representativas, adjuntando el correspondiente control interno de la β -actina para cada uno. En la parte inferior de ambos paneles se muestra el análisis densitométrico efectuado.

Como se observa en el panel A, para el caso del receptor A₁ se detectó un aumento de un 22% ($p < 0,05$) en la cantidad de receptor a nivel de la membrana plasmática tras la exposición de las células C6 a H₂O₂. Por otro lado, en el panel B se muestran los datos obtenidos para el receptor A_{2A}, el cual sufre un aumento en la cantidad total de receptor a nivel de la membrana plasmática de un 27% ($p < 0,05$).

Estos resultados, tomados en conjunto, indican que la exposición de las células C6 a H₂O₂ induce un aumento en la cantidad total de los receptores de adenosina A₁ y A_{2A} a nivel de la membrana plasmática de dichas células.

A continuación se amplió el estudio al principal sistema de transducción al que están acoplados los receptores de adenosina, esto es las variaciones en los niveles del segundo mensajero AMPc. Así se estudió el efecto que ejercía la exposición a H₂O₂ en células C6 sobre la cantidad de enzima adenilato ciclasa que se encontraba presente a nivel de la membrana plasmática. De tal forma que las fracciones de membrana plasmática empleadas en los experimentos anteriores fueron también utilizadas para dilucidar si existían diferencias apreciables a nivel de esta enzima. Para ello se empleó un anticuerpo específico para el subtipo de AC más abundante en el SNC, la AC tipo I (Xia y col., 1993). Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 131. En este caso, el análisis revela que la exposición a H₂O₂ no varía los niveles de esta enzima presentes en la membrana plasmática.

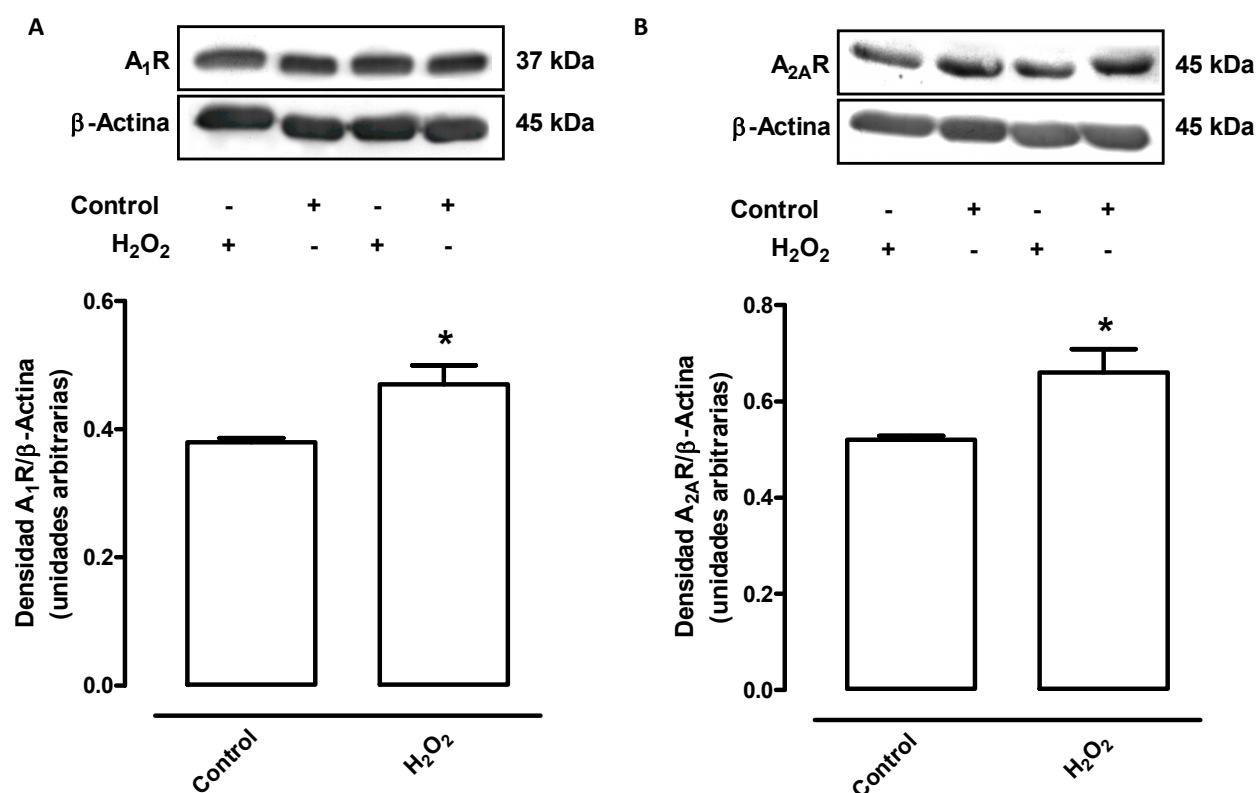
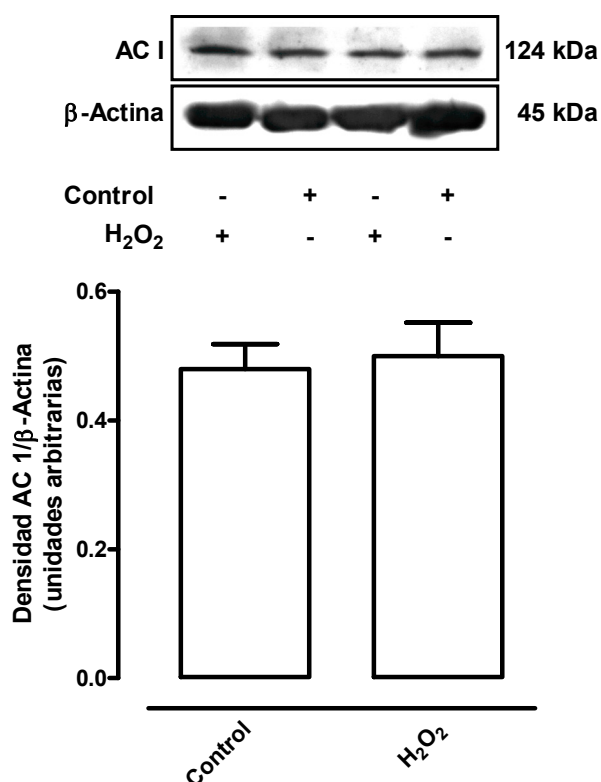


Figura 130: La exposición a H₂O₂ regula al alza los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}. Células C6 fueron expuestas o no a H₂O₂ 500 μM durante 30 minutos antes de realizar aislamientos de membranas plasmáticas por centrifugación diferencial, tal y como se describe en *Métodos*. Se emplearon 30 μg de cada muestra en la separación electroforética. Tras la inmovilización se emplearon anticuerpos específicos para los receptores A₁ y A_{2A} así como para la proteína β-actina como control de carga. Se expone en el panel superior una imagen representativa, los pesos moleculares indicados representan la altura aproximada de las bandas densitometradas. En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Los datos expuestos son las medias ± SEM de 2 experimentos independientes empleando distintas muestras. * p<0,05 significativamente diferente del correspondiente control.

Figura 131: La exposición a H₂O₂ no modula la proteína AC I. Células C6 fueron expuestas o no a H₂O₂ 500 μM durante 30 minutos antes de realizar aislamientos de membranas plasmáticas por centrifugación diferencial, tal y como se describe en *Métodos*. Se emplearon 30 μg de cada muestra en la separación electroforética. Tras la inmovilización se emplearon anticuerpos específicos para la proteína AC I así como para la proteína β-actina como control de carga. Se expone en el panel superior una imagen representativa, los pesos moleculares indicados representan la altura aproximada de las bandas densitometradas. En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Los datos expuestos son las medias ± SEM de 2 experimentos independientes empleando distintas muestras.



Estos resultados muestran que la exposición de las células C6 a H_2O_2 no produce ningún efecto en la cantidad de proteína de la enzima AC tipo I, lo cual no implica necesariamente que la vía de transducción del AMPc no se vea alterada en estas condiciones, ya que una mayor cantidad de receptores de adenosina de los tipos A_1 y A_{2A} podría tener una mayor influencia sobre el sistema de la AC.

Por último, se procedió a comprobar si la exposición a H_2O_2 en células C6 modulaba la expresión génica de los genes que codifican para los receptores de adenosina. Por ello, se realizaron ensayos de PCR a tiempo real con sondas específicas para los receptores de adenosina descritos hasta la fecha: A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 . Los resultados obtenidos para estos experimentos se exponen en la Figura 132.

Como se observa, en el caso de los receptores de adenosina A_1 , A_{2A} y A_{2B} la exposición a H_2O_2 produce un aumento en la expresión de sus genes de un 73, un 37 y un 143%, respectivamente. Sin embargo, sólo en el caso de los genes que codifican para los receptores A_1 y A_{2B} resultaba estadísticamente significativo ($p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente).

Por otro lado, en el caso del gen codificante para el receptor A_3 , los resultados obtenidos indican que la exposición a H_2O_2 produce una disminución aparente en la expresión del mismo de un 27%, sin embargo el análisis estadístico de los datos no revelaba diferencias significativas entre los mismos ($p = 0,143$).

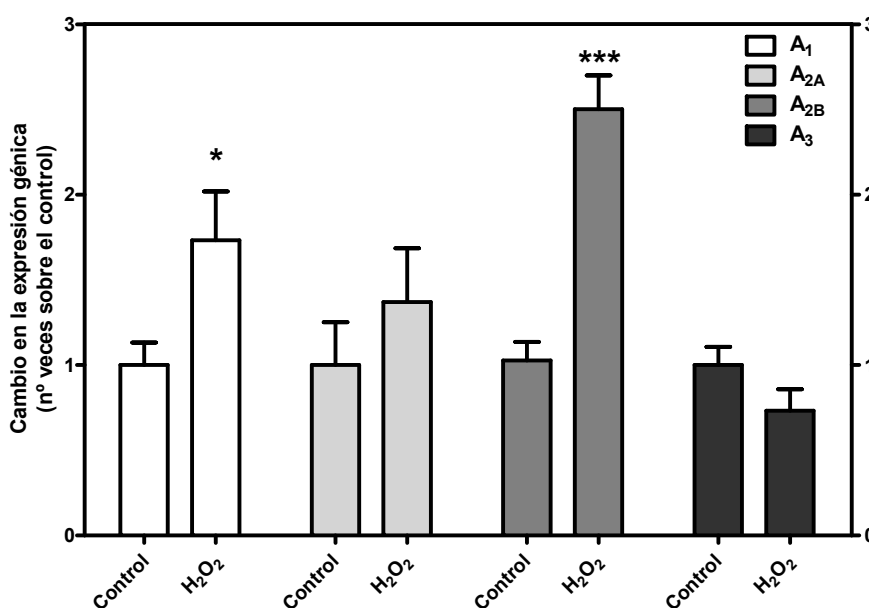


Figura 132: Efecto de la exposición a H_2O_2 sobre la expresión génica de los receptores de adenosina. Células C6 fueron expuestas a H_2O_2 500 μ M durante 30 minutos o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ significativamente diferentes con respecto a su control.

Estos resultados, tomados en conjunto, indican que la exposición de las células C6 de glioma de rata a H_2O_2 modulaba la expresión génica de los receptores de adenosina, aumentando, en algún caso sólo

ligeramente, la expresión de los genes que codifican para A_1 , A_{2A} y A_{2B} y disminuyendo aparentemente la expresión del de A_3 .

De forma adicional se estudió la posible modulación de la expresión génica de los factores de transcripción CREB y CREM, ambos relacionados con la vía del AMPc, como consecuencia de la exposición de las células C6 de glioma de rata a H_2O_2 . Los resultados obtenidos se exponen en la Figura 133, en la cual se observa que existe un aumento del ARNm tanto de CREB como de CREM, que se corresponde con un incremento porcentual de un 63 y un 60%, respectivamente. Sin embargo, este aumento no es significativo en ninguno de los dos casos ($p=0,104$ y $p=0,093$, respectivamente).

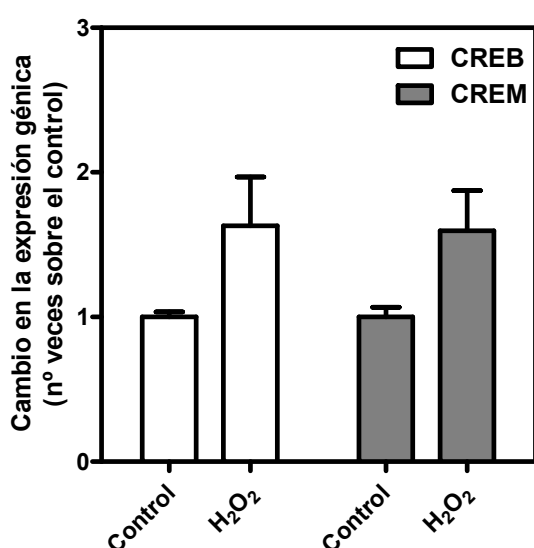


Figura 133: Efecto de la exposición a H_2O_2 sobre la expresión génica de los factores CREB y CREM. Células C6 fueron expuestas a H_2O_2 500 μM durante 30 minutos o se mantuvieron en condiciones control con el fin de aislar su ARN. Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes codificantes para los factores de transcripción mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras.

Estos últimos resultados sugieren que la exposición de las células C6 de glioma de rata a H_2O_2 podría afectar a la expresión de los genes controlados por los factores de transcripción CREB y su modulador CREM. Sin embargo, serían necesarios más experimentos para confirmar estadísticamente esta hipótesis.

d) Tabla resumen.

A continuación se exponen una tabla a modo de resumen con las principales variaciones observadas en los experimentos descritos en este apartado.

	H ₂ O ₂ 500 μM 30 min		H ₂ O ₂ 500 μM 30 min	
Viabilidad	↓	Proteína A ₁	↑	
ARNm caspasa 3	↑	ARNm A ₁	↑	
Proteína mGlu ₁	↑	Proteína A _{2A}	↑	
ARNm mGlu ₁	≈	ARNm A _{2A}	≈	
Proteína mGlu ₅	↓	ARNm A _{2B}	↑	
Proteína mGlu _{2,3}	≈	ARNm A ₃	≈	
Proteína PLCβ ₁	↑	Proteína AC I	≈	
ARNm PLCβ ₁	↑	ARNm CREB	≈	
		ARNm CREM	≈	

Tabla 39: Resumen de los resultados obtenidos en células C6 expuestas a H₂O₂. En esta tabla se exponen gráficamente los resultados numéricos descritos en este capítulo. ≈, no hay variación estadística, ↑, se observa un aumento con respecto a la situación control, ↓, se observa una disminución con respecto a la situación control.

IV.6 Modulación de los receptores de adenosina en un modelo de envejecimiento acelerado.

El modelo de senescencia acelerada en ratones (SAM) es uno de los más apropiados a la hora de estudiar fenómenos de envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad. En los estudios presentados se han empleado las subcepas SAMR1, como modelo de envejecimiento fisiológico, y SAMP8, como modelo de envejecimiento acelerado. Entre las características de los ratones SAMP8 se encuentran: deficiencias en el aprendizaje y la memoria relacionadas con la edad, vida media más corta, disfunciones del sistema inmune y deposición dependiente de la edad del péptido amiloide. El objeto del presente trabajo era estudiar el estado de los receptores de adenosina en este modelo de envejecimiento acelerado (SAMP8) y compararlos con ratones de envejecimiento normal (SAMR1). Para ello se eligieron dos edades a las que realizar el estudio, por un lado, se emplearon ratones jóvenes, de 3 semanas de vida (21 días), y, por otro, ratones de mediana edad, que fueron sacrificados a los 6 meses de vida (180 días). Para la elección de estas edades se tuvo en cuenta que la vida media de los ratones SAMR es de 16,3 meses mientras que la de los SAMP es de, tan solo, 9,7 meses, frente a los 28 meses promedio que vive un ratón de laboratorio normal. Además, estos resultados se completaron con estudios realizados en ratas de la cepa Wistar, en las que se comparó el estado de estos receptores entre los 3 y los 24 meses de vida.

Con el fin de determinar los cambios relacionados con la edad en la expresión génica de los receptores de adenosina, se realizaron ensayos de PCR a tiempo real empleando sondas específicas para cada uno de los 4

genes que codifican para estos receptores. Los resultados, expuestos en la Figura 134, muestran que los niveles de expresión del receptor A_1 aumentan de manera fisiológica con la edad ($p < 0,01$), sin embargo, los ratones SAMP8 no mostraban estas variaciones relacionadas con la edad sino que los niveles de transcrito detectados eran similares a los de los SAMR1 jóvenes. Resultados similares se obtuvieron en el caso de la expresión génica del receptor A_{2B} . En lo que se refiere a los receptores A_{2A} no se observaron cambios relacionados con la edad, aunque al comparar ambas subcepas se observó una disminución significativa de la expresión génica de estos receptores en los ratones SAMP8. En el caso del receptor A_3 se observó un aumento de la expresión génica de estos receptores con la edad, sin embargo no se apreciaron diferencias significativas cuando se estudiaron las variaciones entre las dos subcepas.

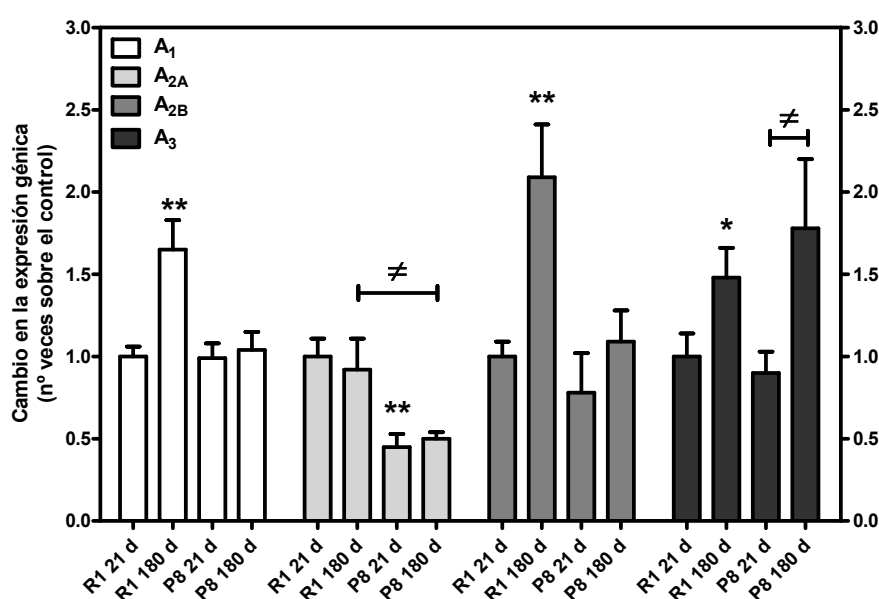


Figura 134: Análisis de la expresión génica de los receptores de adenosina en un modelo de envejecimiento. Se aisló ARN total de homogenizados de cerebro de ratones SAMR1 (R1) y SAMP8 (P8) sacrificados a las 3 semanas (21 d) o a los 6 meses de edad (180 d). Los experimentos de RT-PCR a tiempo real se realizaron empleando sondas específicas para los genes mostrados. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintas muestras. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ significativamente diferentes con respecto a R1 21 d; ≠ $p < 0,05$ variación entre grupos significativa.

Se estudiaron los parámetros cinéticos de los receptores A_1 por ensayos de unión de radioligandos en las subcepas SAMR1 y SAMP8, empleando [3 H]DPCPX como radioligando. Como se expone en la Figura 135, panel A, se observó una disminución de un 38% en el número de receptores A_1 en ratones SAMR1 de mediana edad con respecto a la misma cepa joven ($p < 0,001$), lo que sugiere una disminución en el número de receptores A_1 con la edad. En el caso de los ratones SAMP8 se observó que tanto los ratones jóvenes como los de mediana edad presentaban niveles del receptor A_1 similares entre sí y disminuidos con respecto a los SAMR1 jóvenes (alrededor de un 50%), lo que sugiere que en este modelo de envejecimiento los receptores A_1 están afectados en etapas tempranas del desarrollo y que esta afectación se mantiene a lo largo de la vida del animal, ya que no se encontraron diferencias entre los niveles de receptor A_1 en ratones SAMP8 a distintas edades. Como se expone en el panel B, no se observaron diferencias significativas en la variación de la afinidad de estos receptores con la edad, ni entre los distintos grupos.

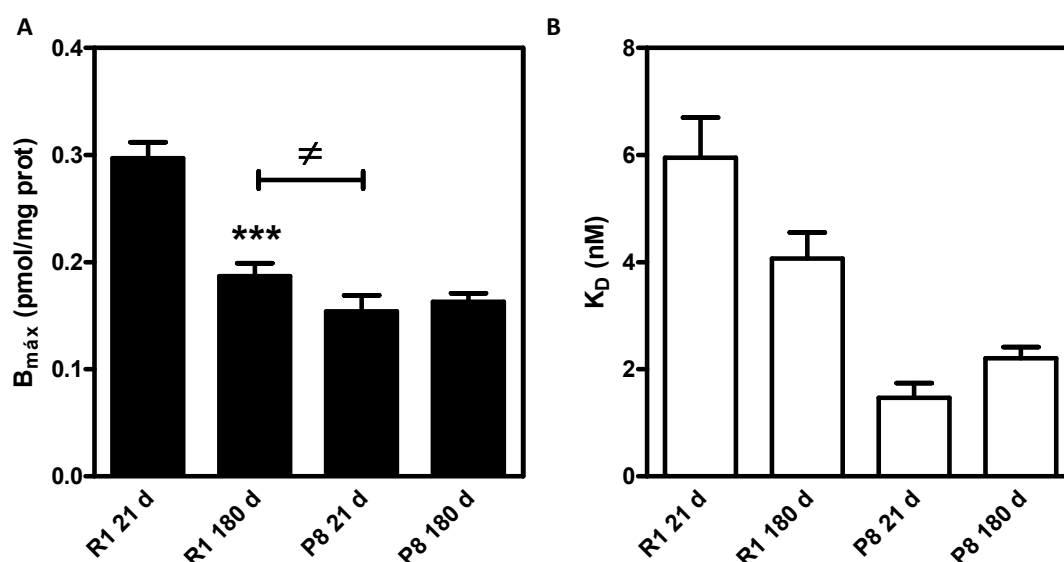


Figura 135: Detección de los receptores A_1 en ratones SAM mediante unión de radioligandos. Se aislaron membranas plasmáticas de cerebro de ratones SAMR1 (R1) y SAMP8 (P8) sacrificados a las 3 semanas (21 d) o a los 6 meses de edad (180 d). Se realizaron ensayos de unión de radioligando empleando [3 H]DPCPX. Los datos expuestos son las medias \pm SEM de 4 experimentos independientes realizados por duplicado empleando diferentes aislamientos. Los parámetros cinéticos calculados, B_{\max} (panel A) y K_D (panel B), se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el *software* GraphPad Prism 5.0. *** $p < 0,001$ significativamente diferente con respecto a los valores obtenidos en los ratones SAMR1 de 21 días; \neq $p < 0,05$ variación significativa entre grupos.

Para confirmar los resultados obtenidos por ensayos de unión de radioligandos y con el fin de ampliar el estudio a los receptores A_{2A} , se realizaron ensayos de *Western blot* en las membranas plasmáticas aisladas de los cerebros de ratones SAMR1 y SAMP8 a los tiempos antes indicados. Como se expone en la Figura 136, panel A, los resultados obtenidos mediante esta técnica son consistentes con los observados mediante el ensayo de unión de radioligando, es decir, de nuevo se aprecia en los ratones SAMR1 una disminución de los receptores A_1 con la edad ($p < 0,05$) mientras que los niveles de receptor detectados en los ratones SAMP8 son similares, en ambos casos, a los detectados en los SAMR1 de mediana edad y significativamente menores que los detectados en los SAMR1 jóvenes (al menos, $p < 0,05$).

En el panel B de la misma Figura se exponen los resultados obtenidos al emplear un anticuerpo específico para el receptor A_{2A} en las mismas muestras. En el caso de los ratones SAMR1 se aprecia un aumento de los receptores A_{2A} con la edad de estos animales ($p < 0,01$), mientras que en los ratones SAMP8 no se aprecian variaciones en estos receptores con la edad. Por otro lado, aunque los niveles de receptores A_{2A} encontrados en los ratones SAMP8 eran algo más elevados que los encontrados en ratones SAMR1 jóvenes, no lo eran lo suficiente como para que esta diferencia resultara estadísticamente significativa.

Por un lado, estos resultados corroboran los obtenidos mediante la técnica de unión de radioligandos en el caso del receptor A_1 , por otro lado, para el receptor A_{2A} , sugieren que estos receptores se encuentran afectados en ratones SAMR1 de mediana edad (6 meses) a causa del envejecimiento. Sin embargo, estos procesos de regulación del receptor A_{2A} no se observan en la cepa SAMP8.

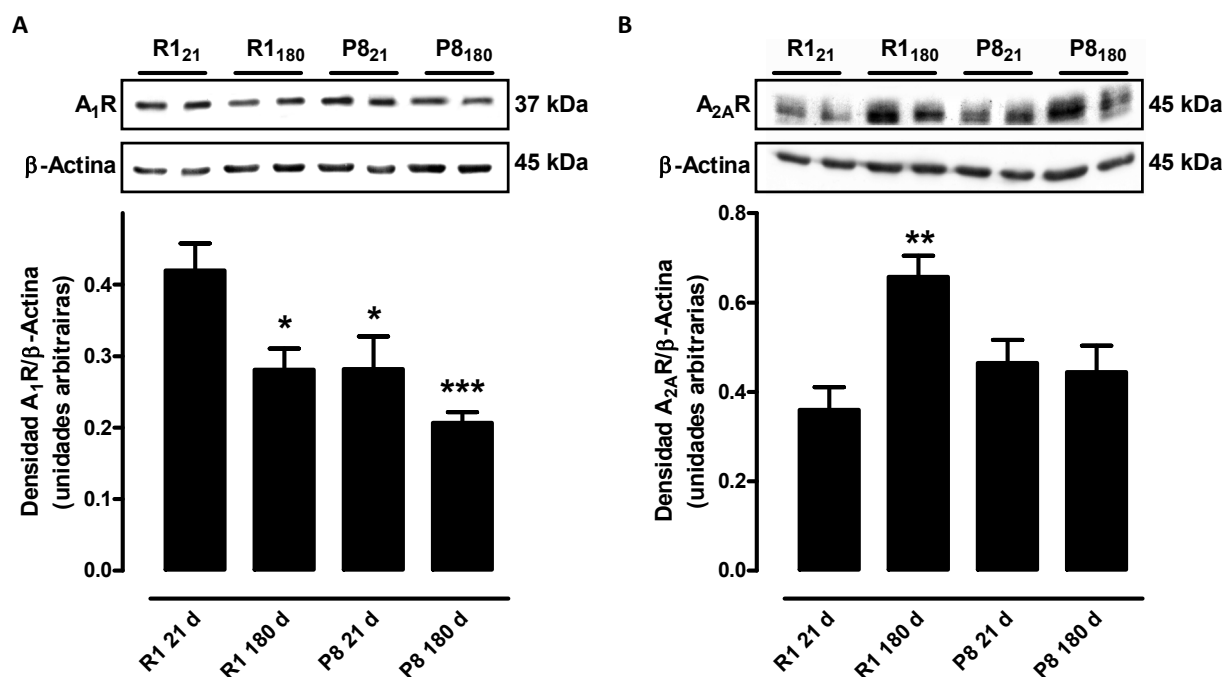


Figura 136: Detección de los receptores A₁ y A_{2A} en ratones SAM mediante Western blot. Se aislaron membranas plasmáticas de cerebro de ratones SAMR1 (R1) y SAMP8 (P8) sacrificados a las 3 semanas (21 d) o a los 6 meses de edad (180 d). Se emplearon 30 µg de cada muestra en la separación electroforética. Tras la inmovilización se emplearon anticuerpos específicos para los receptores A₁ y A_{2A} así como para la proteína β-actina como control de carga. Se exponen en el panel superior imágenes representativas. Los pesos moleculares indicados representan la altura de las bandas densitometradas. En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas obtenidas. Los datos expuestos son las medias ± SEM de 2 experimentos independientes empleando distintas muestras provenientes de distintos animales. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 significativamente diferente de R1 21 d.

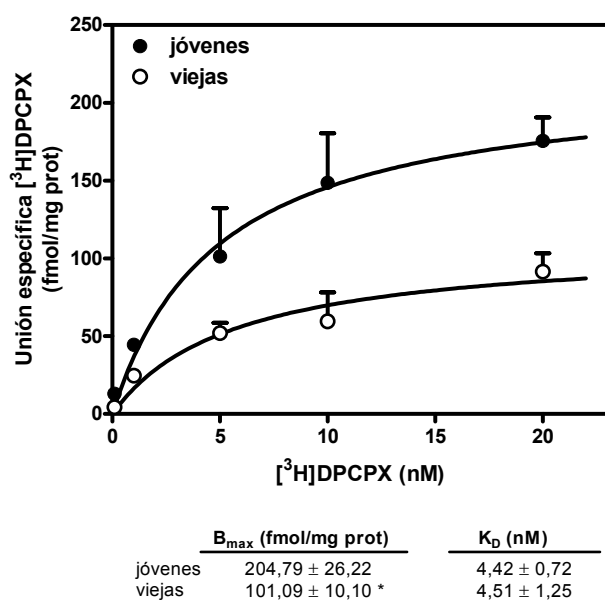


Figura 137: El envejecimiento disminuye los receptores A₁ en cerebro de rata. Se aislaron membranas plasmáticas de cerebro de ratones SAMR1 (R1) y SAMP8 (P8) sacrificados a las 3 semanas (21 d) o a los 6 meses de edad (180 d) con las que se realizaron los ensayos de unión de radioligando empleando el antagonista específico del receptor A₁ [³H]DPCPX. Los datos son las medias ± SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos aislamientos de diferentes animales. Los parámetros cinéticos calculados, B_{max} y K_D, se obtuvieron a partir de los resultados experimentales empleando el software GraphPad Prism 5.0 y se exponen en el panel inferior. * p<0,05 significativamente diferente con respecto al valor obtenido en ratas jóvenes.

El estudio de los receptores de adenosina con el envejecimiento se extendió a cerebros de ratas Wistar. En este caso se emplearon dos grupos de ratas que denominaremos jóvenes (sacrificadas a los 3 meses) o viejas (sacrificadas a los 24 meses). En todos los casos se emplearon membranas plasmáticas extraídas de cerebros de ratas macho en las que se realizaron ensayos de unión de radioligandos así como ensayos de actividad enzimática, con el fin de determinar la funcionalidad del sistema de transducción mediado por el receptor A_1 .

Los resultados obtenidos para los ensayos de unión de radioligandos empleando [3H]DPCPX como antagonista específico de los receptores A_1 se exponen en la Figura 137. Se detectó una disminución significativa en la densidad de los receptores A_1 con la edad ligeramente superior al 50% ($p < 0,05$) sin variación aparente de la afinidad de los mismos.

La evaluación de la funcionalidad del sistema se expone en la Figura 138. Como se observa en el panel A, tanto la actividad basal de la enzima AC como la estimulada se encuentran significativamente disminuidas en ratas viejas con respecto a las ratas jóvenes ($p < 0,05$). Por otro lado, como se expone en el panel B de la misma Figura, la capacidad de CHA en ratas viejas, agonista selectivo del receptor A_1 , de inhibir la actividad enzimática previamente estimulada también se encontraba disminuida con respecto a las ratas jóvenes ($p < 0,05$). En conjunto, estos resultados sugieren que con la edad se produce una desensibilización de la respuesta mediada por los receptores A_1 asociada a la pérdida de receptores en la membrana plasmática.

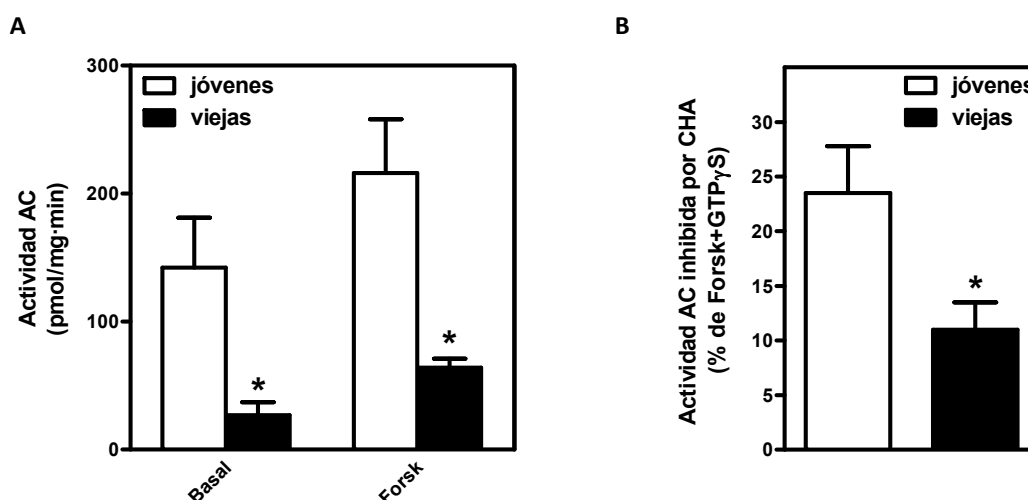


Figura 138: Efecto del envejecimiento sobre la actividad AC. 10-20 μ g de membranas plasmáticas, previamente incubados con ADA, se emplearon en la determinación de los niveles basales de AMPc así como de los observados al estimular con forskolina 10 μ M (Forsk) (panel A). La inhibición de la actividad AC mediada por el receptor A_1 se midió como la capacidad de CHA 1 mM, agonista específico del receptor A_1 , de inhibir la actividad AC estimulada con forskolina 10 μ M más GTP γ S 5 μ M (panel B). Los datos expuestos son las medias \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes realizados por duplicado empleando distintos aislamientos. * $p < 0,05$ significativamente diferente con respecto al valor obtenido en ratas jóvenes.

DISCUSIÓN

V.1. Expresión y caracterización de los receptores de adenosina en células C6.

En este trabajo se han mostrado evidencias bioquímicas, farmacológicas y moleculares de que las células C6 del glioma de rata expresan de manera endógena los cuatro tipos de receptores de adenosina. Además de la identificación y la caracterización completa de los receptores A_1 y A_{2A} , se ha demostrado que están funcionalmente ligados de manera inhibidora o estimuladora a la actividad adenilato ciclasa a través de una proteína G_s o de una proteína G_i sensible a PTX, respectivamente.

Los ensayos de RT-PCR y la posterior detección de la banda correspondiente del fragmento amplificado del ARNm del receptor A_1 , sugieren la presencia de este tipo de receptor en las células C6. El ARNm de este receptor se ha encontrado en diferentes tejidos de rata (Dixon y col., 1996) y en cultivos de astrocitos de diferentes regiones cerebrales (Biber y col., 1997). Estos mismos ensayos permitieron detectar la presencia del ARNm de los receptores A_{2A} , A_{2B} y A_3 . Además, por PCR cuantitativa se determinó que el nivel de expresión de A_1 y A_3 en células C6 era similar y significativamente más alto que el de A_{2A} y A_{2B} . Todos estos tipos de receptores se detectaron por *Western blot* e inmunocitoquímica usando anticuerpos específicos. El anticuerpo de A_{2A} reconoció una banda única con un peso molecular de 45 kDa, correspondiente a la proteína A_{2A} como previamente se describió en otras células astrogliales (Trincavelli y col., 2004). El anticuerpo de A_3 reconoció dos bandas con pesos moleculares de 44 y 52 kDa como previamente se describió en otros tejidos (Christofi y col., 2001).

El ligando DPCPX se empleó para cuantificar los receptores A_1 . La selectividad de este antagonista para determinar los receptores A_1 fue validada mediante curvas de competición con diferentes ligandos específicos. R-PIA mostró la potencia más alta para desplazar la unión de DPCPX, seguido de CHA. Sin embargo ni CGS 21680 ni PSB 1115 causaron desplazamiento alguno. El análisis de las curvas de saturación mostró un único sitio de unión de DPCPX a las membranas plasmáticas de las células C6, cuyos parámetros de unión concordaban con aquellos previamente descritos en membranas celulares de células 28A (Spielman y col., 1992), en vasos deferentes de rata (Smith y col., 1997) y en miocardio de atrio humano (Bohm y col., 1989). Por otro lado, aunque los valores de K_D se correlacionan bien con otros medidos en mamíferos (Falcón y col., 1997), membranas de músculo rugoso (Peachey y col., 1994) y cerebro de cobaya (Klotz y col., 1989), sin embargo, son más altos que los usualmente descritos en membranas de corazón y cerebro bovino, cerebro de rata y adipocitos (Lohse y col., 1987), indicando una afinidad más baja de estos receptores en células C6. Por otra parte el número total de receptores concuerda con los valores descritos en células granulares (Hettinger-Smith y col., 1996) y membranas de astrocitos en cultivo (Biber y col., 1997). Aunque contrasta con los valores descritos en corazón y cerebro bovino, cerebro de rata y adipocitos (Lohse y col., 1987).

Los ensayos de unión realizados en células intactas empleando DPCPX mostraron también una población única de receptores, aunque los parámetros de unión fueron más altos que en las membranas plasmáticas. El descenso en el número total de receptores detectados en las preparaciones de membrana con respecto a las células intactas ya ha sido descrito para CCPA y CGS 21680 en neuronas en cultivo y podría explicarse por la alteración sufrida por los receptores como consecuencia del proceso de homogenización (Nicolas y col., 1994). Resultados similares se han descrito para el receptor A_1 en cultivos primarios de células granulares (Sanz y col.,

1996) y de neuronas (Ruiz y col., 2000). Como todos los ensayos se realizaron en presencia de dipiridamol, un potente inhibidor de la captura de adenosina, los incrementos detectados en el número total de receptores en células intactas no pueden ser debidos a la unión del radioligando a un transportador (Nicolas y col., 1994).

Para caracterizar los receptores A_{2A} se empleo ZM241385 como radioligando selectivo (Palmer y col., 1995; Alexander y Millns, 2001). En membranas de C6 este radioligando mostró una unión saturable con un valor de afinidad similar al obtenido en membranas de las células NG108-15 (Willems y col., 1999). Por otro lado la K_D era más alta que la descrita previamente en otras especies y tejidos como estriado bovino (Palmer y col., 1995) o estriado de rata (Alexander y Millns, 2001). Sin embargo, el gran desplazamiento obtenido de la unión de ZM241385 a bajas concentraciones de CGS 21680, agonista selectivo de A_{2A} , y la incapacidad de PSB 1115 de desplazar la unión confirman la selectividad de este ligando. Nuestros resultados sobre la detección de A_{2A} contrastan con otros descritos previamente (Palmer y Stiles, 1999; Sands y col., 2004). En estos trabajos se emplearon células C6 para expresar el receptor A_{2A} canino sin haber detectado antes el receptor A_{2A} endógeno, probablemente por los diferentes procedimientos de aislamiento de las muestras estudiadas empleados. Mientras que estos autores emplearon homogenados celulares, en los cuales la presencia del receptor debería ser proporcionalmente más baja, en nuestro trabajo se emplearon membranas plasmáticas y células intactas. De hecho se detectan valores de $B_{m\acute{a}x}$ más bajos en membranas que en células intactas como se comentó anteriormente.

Mediante el empleo de técnicas de clonaje molecular y purificación directa han sido detectadas hasta la fecha tres subtipos de proteínas inhibidoras $G_{i\alpha}$, denominadas $G_{i1\alpha}$, $G_{i2\alpha}$ y $G_{i3\alpha}$ (Jones y Reed, 1987). Por ensayos de *Western blot* se detectó una banda con los anticuerpos AS/7 y EC/2 que reconocen las subunidades $G_{i1-2\alpha}$ y $G_{i3\alpha}$, respectivamente. La clave definitiva para dilucidar qué subtipos de las proteínas $G_{i\alpha}$ se encontraban en las células C6 la proporcionaron los ensayos de RT-PCR, donde sólo se obtuvo la banda correspondiente para $G_{i2\alpha}$ y $G_{i3\alpha}$, como se observó en trabajos anteriores (Kim y col., 1988; Yan y col., 1996; El Jamali y col., 1998). Como se describió previamente, $G_{i2\alpha}$ es el sustrato más abundante de la toxina *Bordetella pertussis* en células C6 (Brabet y col., 1988). En sistemas reconstituidos, el receptor A_1 humano y bovino parece interactuar preferentemente con proteínas recombinantes $G_{i\alpha}$ antes que con $G_{o\alpha}$ (Figler y col., 1997). La falta de $G_{i1\alpha}$ y la elevada ribosilación de $G_{i2\alpha}$ (mayor que la de $G_{i3\alpha}$), hacen que $G_{i2\alpha}$ sea un buen candidato para mediar las respuestas del receptor A_1 en células C6.

La ruta de señalización celular principal de los receptores A_1 es la inhibición de la actividad adenilato ciclasa, causando una disminución de los niveles del segundo mensajero AMPc (van Calker y col., 1979; Londos y col., 1980). El empleo de GTP y forskolina produjo un aumento de la estimulación de la actividad AC en C6 dependiente de la concentración, confirmando el estatus funcional de dicha actividad enzimática (Insel y Ostrom, 2003). En membranas de células C6, el ligando CHA produjo una inhibición dependiente de su dosis de la actividad AC previamente estimulada con forskolina y GTP, observándose su efecto máximo a 100 nM. Resultados similares se observaron en células NIH 3T3 transfectadas en lo que se refiere a la inhibición por CPA de la acumulación de AMPc estimulada por forskolina (Reppert y col., 1991) y también en membranas de corteza frontal de rata (Lorenzen y col., 1997). Además, estos datos se asemejan a los descritos en cultivos de

astrocitos, en los que CPA 100 nM mostró la máxima inhibición efectiva de la actividad AC (Murphy y col., 1991). Pianet y colaboradores (Pianet y col., 1989) demostraron que, en células C6, la adenosina estimulaba la actividad AC basal y la activada por isoproterenol, sugiriendo la presencia de un receptor de tipo A_2 acoplado de forma estimuladora a la AC en estas células. Se ha demostrado el estatus funcional de los receptores A_{2A} y A_{2B} en estas células, dado que CGS21680 y NECA fueron capaces de estimular la acumulación de AMPc. La estimulación de CGS21680 fue bloqueada en presencia del antagonista específico de A_{2A} ZM241385, confirmando el papel de los receptores A_{2A} . La aparente falta de efecto de ZM241385 y el efecto bloqueante de PSB 1115, antagonista específico de A_{2B} , en la estimulación de la AC mediada por NECA sugiere que los receptores A_{2B} están también implicados en la respuesta de la AC. Corroborar este hecho la observación en cultivos primarios de astrocitos de rata de estimulación de la AC por NECA vía A_{2B} (Peakman y Hill, 1994).

Las diferencias observadas en la actividad AC basal entre membranas ($0,42 \pm 0,10$ pmol/mg·min⁻¹) y células intactas ($1,2 \pm 0,1$ pmol/mg·min⁻¹) concuerda con la observación efectuada por Daly (Daly, 1984) de que la forskolina estimula menos la formación de AMPc en ensayos empleando células disgregadas que en los que se utilizaban células intactas. Los estudios realizados sobre la estimulación de la AC mediada por forskolina en células intactas revelan una contribución de agonistas endógenos que actúan directa o indirectamente sobre los GPCRs y que se liberan como consecuencia de la exposición a forskolina (Insel y Ostrom, 2003).

Los resultados mostrados demuestran que los cuatro tipos descritos de receptores de adenosina se encuentran presentes de manera endógena en las células C6. No está claro el papel funcional que desempeñan los receptores de adenosina en células tumorales. Algunos autores sugieren que la adenosina extracelular podría interactuar con receptores específicos de membrana influenciando el crecimiento celular y la diferenciación en cultivos de células tumorales. Su efecto dependería de su concentración extracelular así como de la expresión de los diferentes receptores de adenosina, además de los distintos mecanismos de transducción de señales que podrían activarse (Merighi y col., 2003). En células HT29 de adenocarcinoma humano, la enzima adenosina desaminasa y antagonistas del receptor A_1 causan una inhibición del crecimiento celular, sugiriendo que la presencia de los receptores A_1 en estas líneas tumorales podría promover el crecimiento celular (Lelievre y col., 1998). Además, en la línea A375 de melanoma humano, la adenosina desencadena señales de supervivencia a través del receptor A_3 y de muerte celular a través del receptor A_{2A} (Merighi y col., 2002). Existen además evidencias contrastadas de un papel activo del receptor A_{2A} en el crecimiento tumoral y se está planteando la idea de que el receptor A_{2B} también pudiera participar en el crecimiento tumoral así como en procesos de neovascularización, dada su habilidad para promover crecimiento endotelial (Merighi y col., 2003), allá donde los niveles de adenosina fueran lo suficientemente elevados como para activar este receptor de baja afinidad (Melani y col., 2003).

Por otro lado, la expresión del receptor A_3 parece ser baja en tejidos sanos y elevada en células tumorales, incluso se ha sugerido que la sobreexpresión del receptor A_3 podría ser un buen candidato como marcador tumoral (Merighi y col., 2003). Además, como ya se ha comentado, en la línea de melanoma A375 la adenosina promueve el crecimiento celular vía A_3 y la muerte celular vía A_{2A} (Merighi y col., 2002).

Como se ha expuesto, la presencia de los receptores de adenosina en tipos celulares tumorales, sugiere el potencial modulador de la adenosina en procesos de crecimiento tumoral (Ohana y col., 2001; Merighi y col., 2003). Por este motivo, la presencia de los cuatro subtipos de receptores de adenosina descritos hasta la fecha, así como de sus respectivas vías de señalización, en células C6 permite proponer a esta línea celular como candidata para el estudio de la regulación y/o posibles procesos de trans-modulación de estos receptores así como de su implicación en enfermedades tumorales.

V.2. Excitotoxicidad inducida por Glutamato.

V.2.1 En cultivos primarios de neuronas de corteza.

El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante del SNC, actuando a través de receptores específicos participa en funciones tan importantes como el aprendizaje o la memoria. Sin embargo, la sobreexcitación del sistema glutamatérgico produce excitotoxicidad y está implicada en la patología de algunas enfermedades neurodegenerativas. Como se ha expuesto en *Resultados*, ha quedado demostrado el efecto tóxico de la exposición a L-Glu en neuronas corticales. Además, se han descrito los procesos de regulación que sufren los receptores metabotrópicos de glutamato frente a este fenómeno tóxico. La importancia de estos receptores como diana farmacológica ante la neurotoxicidad se basa, entre otros factores, en su capacidad para modular la actividad de determinados canales iónicos, controlando así la excitabilidad neuronal. Esta importancia se ha visto incrementada debido al fallo de los ensayos clínicos realizados con antagonistas de los receptores ionotrópicos (Birmingham, 2002), los cuales habían demostrado sus efectos neuroprotectores tanto *in vitro* como en modelos animales de derrame cerebral, traumatismo cerebral y daño en espina dorsal (Lee y col., 1999).

La viabilidad celular se estudió usando el método del MTT, el cual se basa en la capacidad de las células vivas de transformar este compuesto. Este método ha resultado ser uno de los más eficaces a la hora de cuantificar la toxicidad de una determinada molécula (Puttonen y col., 2008). Aunque, dependiendo del método de cuantificación empleado, existen variaciones acerca de la concentración de glutamato en el sobrenadante de las neuronas corticales *in vitro*, la mayoría de los autores proporcionan datos que se encuentran por debajo del rango de micromolar. Así, en neuronas corticales de rata a 8 DIV se estimó por HPLC que la cantidad de L-Glu en el sobrenadante celular se encontraba alrededor de 100 nM (Antonelli y col., 2004). En cualquier caso, las neuronas corticales resultaron severamente afectadas por la exposición a L-Glu incluso a tiempos y concentraciones bajas (1 μ M durante 2 horas), lo cual concuerda con los fenómenos de excitotoxicidad ampliamente descritos en la literatura. Resultados similares se han observado recientemente en los que la exposición a L-Glu produce muerte celular de forma dosis dependiente en neuronas corticales (Wang y col., 2008).

La regulación observada en los receptores metabotrópicos de glutamato tras la exposición de las neuronas corticales a L-Glu se corresponde con el comportamiento esperable de un GPCR al enfrentarse a su

agonista endógeno, este fenómeno de regulación homóloga se conoce como regulación a la baja o, más comúnmente, por el término inglés *down-regulation*. Los mecanismos por los que se disminuyen los niveles de receptor en la superficie celular están mediados por una serie de quinasas intracelulares capaces de fosforilar de forma específica a los GPCR activados (revisado por [Penela y col., 2003](#)). Por medio de esta fosforilación en el extremo C terminal se reclutan una familia de proteínas llamadas β -arrestinas, las cuales funcionan como adaptadores moleculares y conectan el receptor activado con la maquinaria de endocitosis ([Shenoy y Lefkowitz, 2005](#)). Una vez que se ha internalizado el receptor en una vesícula de clatrina, dependiendo de las condiciones celulares, la vesícula puede dirigirse al lisosoma para su degradación o bien puede recircularse a la membrana plasmática si las condiciones de exposición al agonista han terminado (revisado por: [Marchese y col., 2008](#); [Hanyaloglu y von Zastrow, 2008](#)). Por otro lado, además de los mecanismos clásicos, existe otro mecanismo, demostrado para el mGlu₁, por el que los GPCRs pueden ser internalizados, este mecanismo depende de las GRKs pero no de su actividad quinasa ([Dhami y Ferguson, 2006](#)).

La excitotoxicidad en neuronas ha sido estudiada ampliamente desde la primera descripción de este fenómeno ([Olney y col., 1973](#)). La teoría de la excitotoxicidad se basa en el hecho de que el glutamato, actuando a través de los receptores NMDA, mata a las neuronas inmediatamente después de una lesión cerebral debido a la entrada masiva de calcio (revisado por [Villmann y Becker, 2007](#)). Sin embargo, esta teoría ignora el hecho de que el glutamato es un factor que desencadena la transcripción de factores de supervivencia como CREB ([Hardingham y col., 2002](#)). El papel de los receptores metabotrópicos de glutamato como agentes neurotóxicos o neuroprotectores frente al daño excitotóxico ha sido estudiado en varios modelos celulares y existen evidencias experimentales de la participación de los receptores mGlu en ambos procesos. Los resultados expuestos en la presente *Memoria* sugieren que, en general, tras la exposición de las neuronas a L-Glu, los receptores metabotrópicos del grupo I y del grupo II aumentan su presencia en la membrana plasmática mientras que los del grupo III la disminuyen.

La mayoría de las referencias que relacionan la activación de los receptores del grupo I con neurodegeneración se basan en que su activación puede potenciar el daño producido por los receptores NMDA ([Skeberdis y col., 2001](#); [Pisani y col., 2001](#)). Sin embargo, existe gran cantidad de referencias que apuntan en el otro sentido. La activación de los receptores del grupo I frente al daño excitotóxico implica el desencadenamiento de fenómenos de endocitosis, así como de inhibición de la inflamación, de la adhesión celular y de la muerte celular (revisado por [Baskys y col., 2005](#)). Según estos autores la activación de los receptores del grupo I favorece la endocitosis de los receptores NMDA, lo que reduciría el daño excitotóxico. De entre dichas referencias destaca el trabajo de Bruno y colaboradores, que demuestra que, en neuronas corticales, dos aplicaciones consecutivas de DHPG resultaban neuroprotectoras frente al daño producido por NMDA debido a que se producía un cambio en la funcionalidad en estos receptores tras la segunda aplicación del agonista ([Bruno y col., 2001](#)). Esta observación no era nueva para los receptores metabotrópicos del grupo I, con anterioridad se había demostrado que la liberación de glutamato controlada por los mGlu del grupo I dependía de la actividad previa de estos receptores ([Herrero y col., 1998](#)). Sin embargo, en células de hipocampo, sólo era necesaria una aplicación de DHPG para observar los efectos neuroprotectores, indicando

que el sistema neuroprotección-neurodegeneración dependiente de los receptores metabotrópicos del grupo I depende del tipo celular (Bruno y col., 2001). Otra prueba del papel neuroprotector de los receptores metabotrópicos del grupo I es que la activación de los receptores NMDA en neuronas corticales *in vitro* produce el corte proteolítico por calpaína del receptor mGlu_{1α}, el cual tras la proteólisis es incapaz de activar la cascada neuroprotectora de la PI3K-Akt (Xu y col., 2007a). Una complicación adicional es que se ha demostrado que la función del agonista depende del momento de la aplicación. Así, la activación de los receptores del grupo I antes de la exposición a NMDA era neuroprotectora (Blaabjerg y col., 2003), mientras que si primero se empleaba el NMDA y después el agonista de los mGlu del grupo I se apreciaba un aumento de la toxicidad (Bruno y col., 1995a).

En el caso de los receptores de los grupos II y III los resultados obtenidos parecen contradictorios, ya que ambos receptores desempeñan funciones similares y, sin embargo, se regulan de manera opuesta frente a la exposición a L-Glu. La activación de los receptores del grupo II y III resultaría neuroprotectora debido a que, actuando a nivel presináptico, disminuirían la liberación de glutamato, lo que a su vez disminuiría los aumentos de Ca²⁺ intracelular que este glutamato producirá a nivel postsináptico. Aunque algunos autores afirman que cuando los agonistas de estos receptores funcionan como neuroprotectores, el efecto observado no siempre es debido a la disminución en la liberación de glutamato, sino que acciones moduladoras adicionales podrían ser las responsables de la neuroprotección observada (Calabresi y col., 2000). De hecho, algunos autores proponen que la disminución de los receptores del grupo II observada en modelos de epilepsia estaría relacionada con la susceptibilidad de estas células frente a fenómenos excitotóxicos (Pacheco Otalora y col., 2006). Sin embargo, al igual que con los receptores del grupo I, existe controversia acerca de si estos receptores pueden resultar neuroprotectores (Lafon-Cazal y col., 1999a; Bruno y col., 2000a) o, por el contrario, agravan el daño excitotóxico (Behrens y col., 1999; Lafon-Cazal y col., 1999b). Son, por tanto, necesarios experimentos adicionales que confirmen el papel de estos receptores en las condiciones ensayadas.

Como se ha expuesto en *Resultados*, la enzima PLCβ₁ sufre una modulación dependiente del tiempo de exposición pero independiente de la concentración en el rango que se empleó de L-Glu. Así se observó que, a tiempos cortos, la cantidad de enzima disponible disminuía con respecto al control, mientras que si el tratamiento se prolongaba se observaba que la cantidad de enzima disponible aumentaba. Estos resultados podrían encajar con los argumentos expuestos anteriormente. Por un lado, la acción inicial del glutamato, a través de los receptores NMDA, es aumentar el calcio intracelular, lo que produce la muerte celular y, dado que la enzima PLCβ₁ es el principal sistema enzimático al que están acoplados los receptores metabotrópicos del grupo I, la disminución de la cantidad de esta enzima disminuiría la liberación de calcio del retículo por acción del IP₃, lo que, en principio, podría mitigar el daño excitotóxico. Sin embargo, a tiempos más largos podríamos encontrar que, después de toda la muerte neuronal observada, el principal efecto mediado por el calcio sea neurogénico. Esta hipótesis concuerda con los aumentos de la cantidad de PLCβ₁ observados a tiempos más prolongados de exposición, que contribuiría a la movilización de calcio del retículo, favoreciendo los efectos neurogénicos comentados con anterioridad. Esta regulación, aparentemente contradictoria, concuerda con los motivos esgrimidos por determinados autores a la hora de explicar el fallo de los antagonistas de los receptores

de NMDA en los ensayos clínicos para derrame cerebral, traumatismo cráneo-encefálico y demencia (Ikonomidou y Turski, 2002; Hardingham y Bading, 2003; revisado por Muir, 2006).

Existen en la literatura multitud de referencias acerca del empleo de ligandos de los receptores de adenosina en diversos modelos de toxicidad tanto *in vivo* como *in vitro*. En general, la falta de potentes ligandos para los receptores A_{2B} y A_3 ha limitado el estudio de los receptores de adenosina en condiciones patológicas a los receptores A_1 y A_{2A} . En la presente *Memoria* se ha descrito que en neuronas corticales sometidas a procesos excitotóxicos se produce una regulación al alza, o *up-regulation*, de los receptores A_1 y A_{2A} , tanto a nivel de proteína como de ARNm, que se corresponde con variaciones en la funcionalidad de los mismos, medidas a través del sistema enzimático al que están principalmente acoplados, la inhibición o activación, respectivamente, de la adenilato ciclasa.

El papel neuroprotector de los receptores A_1 de adenosina ha sido ampliamente estudiado en diversos modelos de toxicidad (para revisión ver de Mendonça y col., 2000) principalmente por dos motivos: por un lado, estos receptores presentan una gran capacidad inhibidora de la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica, por otro, son los más abundantes en SNC (para revisión ver Cunha, 2005). Tras diversos estudios realizados en diferentes componentes del SNC frente a diferentes estímulos nocivos se ha llegado a la conclusión de que la activación de los receptores A_1 desempeña un papel neuroprotector. Así se ha demostrado, por ejemplo, en modelos de excitotoxicidad inducido por kainato y ácido quinolínico en hipocampo (MacGregor y col., 1993; MacGregor y col., 1997). Por otro lado, la neuroprotección por activación de los receptores A_1 ha sido comprobada en modelos *in vivo* de diversas enfermedades relacionadas con la excitotoxicidad (Sheldon y Robinson, 2007; Gil y Rego, 2008). Por ejemplo, en un modelo de la enfermedad de Huntington la inyección subcutánea de agonistas del receptor A_1 reducía el daño cerebral (Blum y col., 2002). De igual forma, en un modelo de esclerosis múltiple se observó que tanto la regulación al alza del receptor A_1 como su activación atenuaban la neuroinflamación y la desmielinización observada (Tsutsui y col., 2004). La neuroprotección demostrada por los agonistas de los receptores A_1 se produce a varios niveles. A nivel presináptico la activación de los receptores A_1 inhibe la liberación de neurotransmisores excitadores, entre ellos el glutamato, lo que disminuye los procesos neurotóxicos causados por estos agentes. A nivel postsináptico los receptores A_1 producen la activación de canales rectificadores de K^+ , que producen hiperpolarización neuronal (Dunwiddie y Masino, 2001). Por último, la activación de los receptores A_1 inhibe la acción de los receptores NMDA, reduciendo por tanto la entrada masiva de calcio y los fenómenos excitotóxicos (de Mendonça y col., 1995). El resultado conjunto de todos estos mecanismos es que la activación de los receptores A_1 reduce la excitabilidad neuronal.

En resumen, los resultados expuestos junto con las referencias citadas son consistentes con la idea de que el aumento en la expresión de los receptores A_1 sea consecuencia de un intento de minimizar el daño excitotóxico producido por la exposición a L-Glu. Sin embargo, no es posible aplicar el mismo razonamiento para el aumento detectado en la expresión y funcionalidad de los receptores A_{2A} , ya que, en este caso, apenas existen referencias bibliográficas que justifiquen esta afirmación en neuronas corticales. Por otro lado, en los pocos trabajos en los que los agonistas de los receptores A_{2A} resultan neuroprotectores, como por ejemplo

frente a modelos excitotóxicos en ratas (Jones y col., 1998) o en modelos de hemorragia cerebral *in vivo* (Mayne y col., 2001), no está claro si su acción se produce directamente sobre las neuronas o más bien ocurre a través de mecanismos periféricos como, por ejemplo, la alteración del flujo sanguíneo o de la función inmune (revisado por Stone, 2002). Además, se ha observado que en ciertas condiciones patológicas se produce una regulación al alza de los receptores A_{2A} de adenosina. Este hecho ha sido comprobado en modelos de epilepsia (Rebola y col., 2005a), en modelos de Parkinson (Pinna y col., 2002) así como en cerebros de pacientes de esta enfermedad (Calon y col., 2004). Por parte del grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente *Memoria*, en colaboración con el grupo del Dr. Ferrer, también se ha detectado un aumento en la cantidad de receptor A_{2A} en pacientes de demencia de Pick (Albasanz y col., 2006). Existe por tanto una tendencia en situaciones patológicas relacionadas con el fenómeno excitotóxico a la regulación al alza de los receptores A_{2A} de adenosina, a pesar de que los mecanismos por los que se produce esta regulación no se comprenden en su totalidad hoy en día, este proceso explica por qué, en general, los antagonistas de los receptores A_{2A} proporcionan una robusta protección frente a estímulos nocivos (revisado por Cunha, 2005).

Por último, se ha mostrado que en neuronas corticales expuestas a L-Glu se produce una disminución de la transcripción del elemento CREB. En general, este factor de transcripción promueve la expresión de genes relacionados con la supervivencia neuronal, como se ha demostrado tanto por los modelos de animales deficientes en CREB (Mantamadiotis y col., 2002) como en ensayos de excitotoxicidad en neuronas corticales (Lee y col., 2005). No obstante, la identidad de los genes regulados por CREB parece ser dependiente del tipo celular y del estímulo. Lo que sí se ha determinado es que una de las vías por las que este factor se activa es a través de la activación del receptor NMDA a concentraciones no excitotóxicas (Hardingham y col., 2002), promoviendo señales de supervivencia. Por tanto, según los trabajos previos, parece existir una relación entre la disminución en la viabilidad observada y la disminución en la transcripción de este factor.

V.2.2 En células C6 de glioma de rata.

Las células C6 mostraron una elevada resistencia a la exposición a L-Glu tanto a tiempos cortos como en exposiciones más prolongadas. Resultados similares se observaron en el estudio realizado por Puttonen y colaboradores, donde las células C6 eran más resistentes que las células SH-SY5Y, derivadas de neuroblastoma humano, a los agentes tóxicos 6-hidroxidopamina y AraC (Puttonen y col., 2008). Además, ya ha sido descrito que en células C6 se necesitan exposiciones a cantidades elevadas de L-Glu para observarse efectos nocivos en la viabilidad celular (Sribnick y col., 2006), lo que confirma la elevada resistencia de estas células al daño excitotóxico. Por otro lado, esta mayor resistencia frente a agentes tóxicos podría ser debida al papel neuroprotector que la glía desempeña en el SNC. En este sentido se ha demostrado que la acción de la glía resulta neuroprotectora en cultivos de neuronas granulares (Pérez-Capote y col., 2004), de motoneuronas *in vitro* (Maragakis y col., 2005) o de neuronas de la espina dorsal (Du y col., 2007).

La disminución de los receptores metabotrópicos de glutamato tras 6 horas de exposición a L-Glu confirma resultados obtenidos por este grupo de investigación (Albasanz y col., 2002a). En este trabajo se

demonstró que en C6, tras 6 horas de exposición a L-Glu, se producía la internalización de los receptores mGlu mediada por vesículas de clatrina. Algunos autores proponen que esta regulación ocurre en periodos de tiempo cortos tras la exposición a agonistas (Doherty y col., 1999). Por otro lado, este fenómeno ha sido comprobado a tiempos más cortos de exposición a agonista por otros grupos de investigación (Liu y Kirchgeßner, 2000; Mundell y col., 2001; Iacovelli y col., 2004; Pelkey y col., 2007). Existen referencias bibliográficas que avalan una habilidad mucho menos conocida de los GPCR, su capacidad de ser regulados al alza por exposición crónica a su agonista. Este fenómeno ha sido descrito para los receptores β_3 -adrenérgicos (Thomas y col., 1992), los receptores de la hormona liberadora de gonadotropina (Loumaye y Catt, 1983), los de la hormona liberadora de tirotrófina (Cook y Hinckle, 2004), los nicotínicos de acetilcolina (Gentry y Lukas, 2002) y los de somatostatina de tipo 1 (Ramírez y col., 2005). Además, se ha descrito que diferentes subtipos del receptor de somatostatina humano pueden ser regulados de manera diferente cuando se exponen al mismo agonista, así los subtipos 2, 3, 4 y 5 se internalizan a tiempos cortos de exposición mientras que los subtipos 1, 2 y 4 se regulan al alza después de una prolongada exposición a su agonista (Hukovic y col., 1996). No obstante, los mecanismos moleculares que controlan esta habilidad de algunos GPCRs no se conocen en la actualidad, aunque algunos autores sugieren que este aumento de receptor dependiente de agonista se basa bien en el reclutamiento de los reservorios de receptor existentes en la membrana plasmática (Hukovic y col., 1996) o bien en procesos post-transcripcionales (Gentry y Lukas, 2002). La regulación al alza de los receptores mGlu observada tras 24 y 48 horas podría ser debida a la suma de los procesos de reciclaje de los receptores antes internalizados como consecuencia de la exposición al agonista durante un largo periodo de tiempo (revisado por: Marchese y col., 2008; Hanyaloglu y von Zastrow, 2008) más el resultado de un proceso de síntesis *de novo*, aunque serían necesarios experimentos adicionales que corroboraran esta hipótesis.

Como se comentó en el apartado anterior existe controversia acerca del papel desempeñado por los receptores metabotrópicos del grupo I en situaciones patológicas. Se ha demostrado que a nivel fisiológico los receptores mGlu₁ activan, a través de la PKC, los canales de calcio dependientes de voltaje (Endoh, 2004), lo que, en principio, facilitaría los procesos neurotóxicos (Gee y Lacaille, 2004). Los primeros datos que proporcionaron evidencias de que la activación de los receptores del grupo I aumentaba el daño producido por el NMDA datan de 1995. En estos experimentos, el empleo de DHPG exacerbaba el daño producido por la exposición de cultivos mixtos de neuronas y astrocitos a NMDA (Bruno y col., 1995a). Desde entonces la eficacia de los antagonistas del grupo I ha sido demostrada tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*. Entre otros estudios, en modelos *in vitro* se ha observado que los antagonistas de los receptores del grupo I eran neuroprotectores en modelos de envejecimiento de hipocampo (Attucci y col., 2002) y que los agonistas aumentaban la toxicidad de la exposición a homocisteína en neuronas granulares (Zieminska y col., 2003). Por otro lado, los antagonistas de los receptores del grupo I resultaron neuroprotectores en modelos *in vivo* de Parkinson en ratas (Vernon y col., 2005) y ratones (Aguirre y col., 2001). Sin embargo, parece que se requiere un estudio de cada situación patológica para poder establecer la función de cada tipo de receptor, de hecho, en cerebros de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica se encontró que los grupos de motoneuronas vulnerables expresaban más mGlu₁ y menos mGlu₅ que los grupos de motoneuronas resistentes (Ma y col.,

2006), lo que llevó a los autores a concluir que esta expresión diferencial de los receptores del grupo I era lo que podría hacer a estas neuronas más susceptibles de degenerar.

La concentración extracelular de glutamato es controlada fundamentalmente por las células gliales, principalmente astrocitos, las cuales, a través de los transportadores de glutamato, son las encargadas de mantener los niveles extracelulares de glutamato en concentraciones por debajo de la neurotoxicidad (Frizzo y col., 2001). Se han descrito hasta la fecha en mamíferos 5 subtipos de transportadores de glutamato, denominados en humanos de EAAT1 a EAAT5 (*Excitatory Amino Acid Transporters*) y en roedores GLAST, GLT1, EAAC1, EAAT4 y EAAT5 (revisado por Shigeri y col., 2004), de los cuales las C6 sólo expresan EAAC1 (Yao y col., 2005), aunque los principales en astrocitos sean GLAST y GLT1 (Anderson y Swanson, 2000). En células gliales el glutamato es transportado al interior celular por estos EAATs, donde se transforma en glutamina y se almacena en vesículas. Estas vesículas se liberan y la glutamina alcanza el terminal presináptico, donde es capturada y transformada en glutamato, el cual se almacena de nuevo en vesículas. Todos estos procesos constituyen el ciclo glutamato-glutamina en el cerebro (revisado por McKenna, 2007). Alteraciones en cualquiera de los mecanismos de transporte descritos así como de las enzimas implicadas en estos procesos pueden dar lugar a una incorrecta homeostasia del glutamato que desencadene procesos patológicos. Por ejemplo, se ha demostrado que en cortes de hipocampo sometidos a hipoxia severa los transportadores funcionaban liberando glutamato al medio, en vez de retirándolo, lo que producía la muerte neuronal (Rossi y col., 2000). Por otro lado, los receptores metabotrópicos de los grupos II y III han sido relacionados con fenómenos de neuroprotección en C6 frente a MPP⁺, una sustancia empleada para inducir parkinsonismo en primates, quedando demostrado que su activación aumentaba la captura de glutamato en estas células (Yao y col., 2005). En el trabajo de Yao y colaboradores se detectó un aumento de los receptores del grupo III tras prolongadas exposiciones a L-Glu. El papel neuroprotector de la activación de los receptores del grupo III ya ha sido demostrado previamente en microglía, donde la activación de estos receptores protegía a las neuronas granulares frente a la toxicidad inducida por el LPS (Taylor y col., 2003). Sin embargo, no está claro el mecanismo por el cual la activación de estos receptores en células gliales puede ser neuroprotectora, aunque se postulan varios mecanismos. Así, se ha demostrado que inhiben la liberación de quimiocinas pro-inflamatorias (Besong y col., 2002) y que inducen la liberación de TGF- β (*transforming growth factor*) en células gliales (Bruno y col., 1998), a través de las MAP quinasas y la PI3K (D'Onofrio y col., 2001). Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales que confirmen la hipótesis de que los receptores metabotrópicos del grupo III son neuroprotectores frente a la acción del glutamato en C6 y por qué vía o vías ocurre esa protección.

Los receptores de adenosina A₁ y A_{2A} se regulan en sentido opuesto en las células C6 en condiciones de excitotoxicidad. Como se ha expuesto en la presente *Memoria*, se ha apreciado un aumento del receptor A₁ a nivel de proteína y de función, por el contrario, los niveles así como la funcionalidad de los receptores A_{2A} resultaban disminuidos. Teniendo en cuenta que las células C6 han demostrado ser resistentes al daño excitotóxico, es razonable plantear la hipótesis de que las variaciones anteriormente descritas en los receptores de adenosina están encaminadas a preservar la viabilidad celular. Esta hipótesis se ajusta a las

funciones comúnmente aceptadas para los receptores de adenosina, es decir, la activación de la vía inhibitoria del receptor A₁ es neuroprotectora así como también lo es el bloqueo de la vía estimuladora del receptor A_{2A}.

Las características neuroprotectoras de la activación del receptor A₁ en diversos modelos celulares ya han sido expuestas en el apartado anterior, por lo que aquí sólo se expondrán algunas particularidades de las células gliales. Por un lado, los receptores de adenosina controlan la liberación de diversas sustancias que pueden influenciar la actividad neuronal, así como su viabilidad. Por ejemplo, se ha descrito que la activación del receptor A₁ promueve la liberación de NGF (*nerve growth factor*) en cultivos primarios de astrocitos (Cicarelli y col., 1999) o de interleucinas, como la IL-6 que presenta propiedades neuroprotectoras (Schwaninger y col., 1997). Por otro lado, los receptores de adenosina, al igual que en neuronas, pueden modular la función de otros sistemas de receptores, como ocurre con la otra familia de receptores que es objeto de estudio de esta *Memoria*, los receptores metabotrópicos (Cormier y col., 2001), así como modular el metabolismo celular. Existen, por tanto, bastantes vías por las que la activación de los receptores A₁ puede desencadenar fenómenos protectores en células C6.

Existen en la bibliografía evidencias robustas de que el bloqueo de los receptores A_{2A} resulta neuroprotector. Aunque los primeros trabajos empleando antagonistas de los receptores A_{2A} como agentes neuroprotectores datan de principios de los 90, no fue hasta unos años más tarde cuando se aceptó definitivamente la implicación de la inactivación, genética o farmacológica, de los receptores A_{2A} en procesos neuroprotectores en modelos de isquemia *in vivo* (Monopoli y col., 1998; Chen y col., 1999). Además, también se ha demostrado la capacidad neuroprotectora de los antagonistas de los receptores A_{2A} en modelos de excitotoxicidad inducidos por kainato (Lee y col., 2004b) o por la administración de ácido quinolínico (Popoli y col., 2002). De la revisión de estos trabajos se desprende que la neuroprotección observada en modelos *in vivo* por el bloqueo de los receptores A_{2A} es más robusta en regiones corticales que en ganglios basales, donde tradicionalmente se ha creído que estos receptores eran más abundantes. Esta observación concuerda con los resultados obtenidos en la presente *Memoria*, donde se observa que la expresión de los receptores A_{2A} en neuronas de corteza y células gliales C6 es similar a la observada para los receptores A₁, aunque contrasta con lo observado previamente empleando [³H]CGS 21680 como radioligando (Lopes y col., 2004).

A pesar de los efectos tan claros que se han observado por el bloqueo de los receptores A_{2A} frente a diferentes estímulos nocivos no se conocen con exactitud los mecanismos que conducen a esta protección celular. En el caso de las células gliales, este hecho se ve incrementado por la escasez de trabajos *in vitro* que avalen la eficacia de los antagonistas de los receptores A_{2A} frente a fenómenos tóxicos y que faciliten el estudio de las funciones que desempeñan en estos procesos. Se ha establecido que los receptores de adenosina controlan en células gliales la astrogliosis mediante la activación de los receptores A_{2A} (Brambilla y col., 2003), así como que la activación de estos receptores produce una disminución en el transporte de glutamato al interior de los astrocitos (Pintor y col., 2004) y con un incremento en la liberación del mismo (Nishizaki y col., 2002). Sin embargo, se desconoce con exactitud la contribución de estos fenómenos a la neuroprotección demostrada por los antagonistas de los receptores A_{2A}.

En lo que respecta a la transcripción del factor CREB, dadas las razones esgrimidas en el apartado anterior, es lógico suponer que la disminución en la transcripción de CREB puede constituir el paso previo a la muerte celular, que, en teoría podríamos observar si se prolongase la exposición a L-Glu. A tiempos más cortos, se podría responsabilizar a los niveles basales de expresión de este factor de la supervivencia celular observada, a diferencia de lo observado en neuronas. No obstante, experimentos adicionales, como la comprobación de los niveles de CREB fosforilado, se requerirían para corroborar o desmentir estas hipótesis.

V.3. Efecto de la hipoxia sobre las células de SNC.

V.3.1 En cultivos primarios de neuronas de corteza.

Con los experimentos desarrollados en este capítulo se ha demostrado la modulación sufrida por los receptores metabotrópicos de glutamato, los receptores de adenosina y las vías de transducción principales a las que estos receptores se encuentran acoplados, cuando las neuronas corticales fueron expuestas a hipoxia moderada.

Este modelo se planteó a partir de estudios descritos en la bibliografía que proponían que la familia de factores HIF se activaba *in vitro* cuando la cantidad de oxígeno disminuye del 5% (40 mm de Hg) (Pouysségur y col., 2006), siendo esta activación, además, progresiva según decrece la cantidad de oxígeno disponible (Brahimi-Horn y Pouysségur, 2006). Dado que existen en la bibliografía multitud de estudios realizados en diversos componentes del SNC a bajas presiones parciales de oxígeno, generalmente por debajo del 2%, y que el cerebro humano es especialmente sensible a la privación de oxígeno (Lee y col., 2000a), se decidió realizar este estudio a niveles de hipoxia más moderados (5% O₂).

Las condiciones de hipoxia moderada inducen procesos de muerte celular sobre las neuronas corticales de cerebro de rata *in vitro*, como se ha demostrado en el test de viabilidad empleado. La evaluación de la morfología celular, así como el incremento en la cantidad de ARNm del gen codificante para caspasa 3, permiten afirmar que la muerte celular detectada es de tipo apoptótico.

La viabilidad celular se estudió mediante un kit comercial disponible basado en el compuesto MTT, el cual relaciona la toxicidad de una determinada sustancia con el efecto que ésta ejerce sobre la funcionalidad celular, incluida la actividad mitocondrial. Según se ha expuesto, la hipoxia moderada reducía la viabilidad celular tras 24 horas de exposición de las neuronas corticales *in vitro*. Este resultado es el esperado para células del SNC (Lee y col, 2000), aunque otros tipos celulares, como los fibroblastos en cultivo, interrumpen su ciclo celular frente a la hipoxia pero permanecen viables (Schmaltz y col., 1998) y en el caso más extremo, descrito para la línea C6 de glioma de rata, la proliferación continúa y no ocurre muerte celular (Castillo y col., 2008).

Está descrito en la literatura que la disminución en la disponibilidad de oxígeno induce procesos apoptóticos en tumores humanos que podrían ejercer incluso una presión selectiva sobre las células cancerígenas más resistentes (Weinmann y col., 2004). Este fenómeno también se observa *in vitro* en cultivos

primarios de corteza de cerebro de rata sometidos a hipoxia severa (Hejmadi y col., 2003) o incluso en otros tipos celulares como son los cardiomiocitos (Ren y col., 2008) o las células endoteliales (Hung y col., 2007), confirmando los resultados obtenidos en nuestros cultivos. Es destacable que en todos ellos se emplearon condiciones de privación de oxígeno más severas que las empleadas en estos estudios, lo que valida la hipótesis de que es a presiones parciales de oxígeno menores al 5% cuando se empiezan a hacer patentes los efectos de la hipoxia.

Sin embargo, en un modelo similar de neuronas corticales de cerebro de rata (Delgado-Esteban y col., 2002) la exposición *in vitro* de estas neuronas a condiciones cercanas a la anoxia durante una hora no produjo diferencias en la viabilidad celular. Esta aparente controversia puede ser debida a tres motivos. El primero de ellos es que el tiempo de exposición empleado (1h) no sea suficiente como para observar los efectos nocivos de la hipoxia. El segundo se basa en el hecho de que el método empleado para cuantificar la muerte celular en este trabajo, tinciones de la cromatina con Hoechst o yoduro de propidio, es mucho menos sensible que el método basado en MTT empleado en la presente *Memoria* para detectar variaciones en la viabilidad celular. Por último, los experimentos se realizaron en neuronas corticales a 9 DIV, frente al rango de 14 a 18 DIV empleados en este trabajo, lo que podría suponer una menor vulnerabilidad del cultivo primario al daño producido por la privación de oxígeno.

Es conocido desde hace algunos años que la hipoxia y/o la isquemia inducen la liberación de adenosina con fines neuroprotectores (Fredholm, 1997), sin embargo, junto con este neuromodulador se liberan otros neurotransmisores, incluyendo los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato (Phillis y col., 1991), el inhibidor GABA (Phillis y col., 1991), noradrenalina (Globus y col., 1989) y acetilcolina (Kumagae y Matsui, 1991), siendo, en principio, los aminoácidos excitadores los responsables del daño neuronal que ocurre como consecuencia de los episodios hipóxicos/isquémicos (Lipton y Rosenberg, 1994). En este trabajo se ha demostrado que la exposición de neuronas corticales de cerebro de rata al modelo descrito de hipoxia moderada produce un aumento del número total de los receptores metabotrópicos de glutamato en la superficie celular sin que ello afecte a su afinidad. El estudio más específico de cada subtipo de receptor indicó que los subtipos mGlu₁, mGlu₅ y mGlu_{2,3} son responsables, si no totalmente, al menos, parcialmente del aumento observado. Sin embargo, este patrón no se observaba a nivel del ARNm de los subtipos mGlu₁ y mGlu₅, siendo la expresión del primero disminuida con la hipoxia moderada mientras que la del segundo no se veía alterada a lo largo de estos procesos. Interesantemente, la enzima PLCβ₁, principal isoforma la PLC en SNC, se comportaba en sentido contrario al observado para los receptores metabotrópicos del grupo I a los que está acoplada, describiéndose en este caso una disminución de la cantidad de esta enzima no justificable por variaciones en su expresión génica. Sin embargo, los ensayos enzimáticos realizados demostraron que la vía de transducción de señales que implicaba a los receptores metabotrópicos del grupo I y a la enzima PLC no resultaba alterada como consecuencia de la hipoxia moderada en neuronas corticales de cerebro de rata, podemos suponer que ello es debido a mecanismos de compensación.

La isoforma β₁ de la enzima PLC juega un papel importante en la transducción celular de señales de supervivencia y se ha observado que su sobreexpresión protegía los fibroblastos NIN3T3 del daño oxidativo *in*

vitro (Lee y col., 2000b). De forma análoga, en cultivos primarios de neuronas corticales se ha observado que el estrés químico del retículo endoplásmico producía, de forma dosis dependiente, una disminución en la viabilidad que iba acompañada de una disminución similar en la expresión de la isoforma β_1 de la PLC (Yasuda y col., 2008). Otro estudio que relaciona la PLC β_1 con los receptores metabotrópicos del grupo I es el realizado por Nagasaka y colaboradores, en el que demostraron que la teína, un componente del té verde, ejercía un efecto neuroprotector en cultivos primarios de neuronas corticales frente a la exposición a glutamato como consecuencia de la activación de los receptores metabotrópicos del grupo I, los cuales aumentaban la expresión de la proteína PLC β_1 , evitando así la muerte neuronal (Nagasaka y col., 2004). Estos resultados concuerdan con los presentados en esta sección de la presente *Memoria*, en la que el aumento en la expresión de los receptores metabotrópicos del grupo I se puede explicar como un intento de paliar las deficiencias en la vía de señalización a la que están principalmente acoplados, ésta es, el aumento del calcio intracelular, deficiencias producidas por la disminución en los niveles de la enzima PLC β_1 . De hecho, se observa que el efecto final de la exposición a agonistas de los mGlu del grupo I en este modelo propuesto de hipoxia moderada no se diferencia del observado en neuronas corticales mantenidas en condiciones de normoxia.

Esta hipótesis se apoya en el hecho observado experimentalmente por otros grupos de investigación de que, en general, el empleo de agonistas de los receptores metabotrópicos del grupo I en modelos de daño cerebral por hipoxia/isquemia resulta neuroprotector. Este modelo de neuroprotección se ha descrito en neuronas hipocámpales sometidas a anoxia (Maiese y col., 1996), en cortes de hipocampo durante la hipoxia/hipoglicemia (Schröder y col., 1999), en cultivos primarios de neuronas granulares (Kalda y Zharkovsky, 1999; Kalda y col., 2000) y en cerebro neonatal de rata (Camboine y col., 2000). Según parece, la clave de la neuroprotección ejercida por los receptores metabotrópicos del grupo I se basa en la capacidad de estos de activar la PKC (Schröder y col., 1999; Maiese y col., 1996), cuya acción neuroprotectora ya ha sido demostrada en otros modelos *in vitro* de daño cerebral (Cordey y Pike, 2006).

Aunque el aumento de los receptores del grupo I y la disminución de la enzima PLC β_1 puedan parecer acciones contradictorias, recientemente, se ha descrito por este grupo de investigación, en colaboración con el Dr. Ferrer, resultados similares en el estudio de la corteza cerebral de pacientes con demencia con cuerpos de Lewy en su forma pura (Dalfó y col., 2004).

Sin embargo, existen algunos autores que postulan que la activación de los mGlu del grupo I podría incrementar el daño celular en los procesos post-isquémicos, ya que, según demostraron Meli y colaboradores (Meli y col., 2005) en células BHK (*Baby hamster kidney*) transfectadas con mGlu $_1$ y mGlu $_5$, la activación de estos receptores estimulaba la actividad de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), enzima relacionada con procesos de reparación del ADN y cuya hiperactividad se relaciona con mecanismos de muerte celular, lo cual hace que la función exacta de esta enzima sea todavía controvertida (Nicoletti y Stella, 2003).

Según observaron Casolini y colaboradores (Casolini y col., 2005) en un modelo de hipoxia post-natal, los niveles de ARNm de los receptores mGlu del grupo I disminuían en hipocampo y corteza como consecuencia de la hipoxia a la que eran sometidos los neonatos. Estos resultados concuerdan parcialmente con los presentados en la presente *Memoria*. Sin embargo, debido a la cantidad y variedad de procesos intermedios que ocurren

desde que se sintetiza el ARNm hasta que se obtiene la proteína funcional existe todavía, en la actualidad, cierta controversia acerca de la relación existente entre los niveles de ARNm y de proteína en los casos en los que no se observan variaciones en el mismo sentido. Algunos autores atribuyen estas variaciones a defectos en la maquinaria celular que ocurren en ciertas patologías ([Martín-Ruiz y col., 2004](#)), sin embargo no hay evidencias experimentales que corroboren ninguna hipótesis.

La regulación de los receptores metabotrópicos del grupo II ha sido estudiada más a fondo a lo largo de estos últimos años dado que, debido a sus funciones conocidas es más fácil explicar su posible papel neuroprotector. De este modo, se postula que los receptores mGlu del grupo II, a nivel postsináptico reducirían la excitabilidad neuronal como resultado de la disminución en la formación de AMPc o la modulación de determinados canales iónicos (para revisión ver [Tamaru y col., 2001](#)). Por otro lado se llevó a cabo en 2003 un estudio exhaustivo de la expresión de mGlu_{2,3} en especies tolerantes a anoxia ([Poli y col., 2003](#)), del que se dedujo que, en el cerebro de estas especies, la expresión de los receptores mGlu del grupo II era significativamente más elevada, resultando además sus agonistas neuroprotectores en este modelo. No obstante, otros trabajos en cerebro de rata ([Cai y col., 1999](#)), en células granulares ([Kalda y Zharkovsky, 1999](#)) o en retina ([Beraudi y col., 2007](#)), apoyan este efecto neuroprotector descrito principalmente en *Carassius auratus* por Poli y colaboradores ([Poli y col., 2003](#)). Estos trabajos confirman los resultados obtenidos en la presente *Memoria*, en los que se observa un incremento de la expresión de los receptores mGlu del grupo II en la superficie celular de las neuronas corticales como consecuencia de la exposición a bajas presiones parciales de oxígeno. Este aumento va además acompañado de una potenciación en la vía de señalización mediada por estos receptores, lo que corroboraría el papel neuroprotector de los agonistas de los receptores del grupo II como agentes capaces de disminuir la cantidad de AMPc intracelular.

Por último, en lo que se refiere a los mGlu pertenecientes al grupo III, la potenciación de su vía de señalización en el modelo descrito de hipoxia moderada concuerda con los trabajos descritos en la literatura, en los que la activación de los mGlu del grupo III resulta neuroprotectora por motivos similares a los esgrimidos en el caso de los agonistas de los receptores del grupo II. En este sentido, se ha descrito el efecto neuroprotector de agonistas del grupo III en modelos de hipoxia/isquemia en neuronas hipocámpales *in vitro* ([Maiese y col., 1996](#)) y en cortes de hipocampo ([Sabelhaus y col., 2000](#)). El trabajo aquí presentado constituye el primer estudio realizado hasta la fecha sobre la expresión proteica de los receptores metabotrópicos durante los procesos de hipoxia moderada en neuronas corticales.

En la presente *Memoria* se ha descrito que las neuronas corticales de cerebro de rata sometidas al modelo descrito de hipoxia moderada sufren una modulación de los receptores de adenosina presentes en la membrana celular. En concreto, se observa que la densidad de los receptores A₁ aumenta mientras que la de los A_{2A} disminuye significativamente en la membrana plasmática de estas células, sin que sea modulada la expresión génica de ambos receptores. Por otro lado, se observó, en los ensayos enzimáticos realizados, una potenciación de la vía de señalización principal mediada por estos receptores.

Sin embargo, esta respuesta descrita es la contraria que se esperaría teniendo en cuenta la liberación de adenosina que ocurre durante la hipoxia, de hecho se ha descrito anteriormente que ocurren procesos de

desensibilización e internalización de los receptores A_1 en hipocampo de rata durante la anoxia (Coelho y col., 2006), así como procesos de disminución en la unión de radioligandos en varias zonas cerebrales en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media (Nagasawa y col., 1994) y en un modelo de isquemia cerebral transitoria (Onodera y col., 1987), aunque éste no es un comportamiento general para los receptores A_1 en todas las áreas cerebrales (Lee y col., 1986). Por otro lado, el efecto contrario, es decir, un aumento de los niveles del receptor A_{2A} , se ha observado en células PC12 sometidas a 5% de O_2 durante 12 horas (Kobayashi y Millhorn, 1999).

Son conocidas las propiedades neuroprotectoras de los agonistas del receptor A_1 en modelos de hipoxia/isquemia (revisado por de Mendonça y col., 2000), aunque no está tan claro la función de los antagonistas de los receptores A_{2A} en estas situaciones (revisado por Cunha, 2005). Por este motivo es razonable suponer que el significado fisiológico de los efectos observados en neuronas corticales sometidas a hipoxia moderada sobre estos receptores es un intento celular de minimizar el daño cuando las condiciones de disponibilidad de oxígeno no son favorables, mientras que la disminución de los niveles del receptor A_1 y el aumento de los del receptor A_{2A} en condiciones de anoxia podría entenderse como una disfunción en la regulación de estos receptores como resultado de un proceso patológico. Esta hipótesis se sustenta, además, en el hecho demostrado de que los ratones deficientes en el receptor A_1 , a pesar de ser viables, al ser sometidos a hipoxia presentaban una muerte embrionaria elevada y un profundo retraso en el crecimiento acompañado de diversas malformaciones, lo que demuestra el papel neuroprotector de los receptores A_1 durante la hipoxia pre-natal (Wendler y col., 2007).

Las células neuronales responden a la disminución de oxígeno incrementando la liberación del neuromodulador adenosina, tanto en sistemas *in vivo* (Van Wylen y col., 1986; Phillis y col., 1987) como en sistemas *in vitro* (Fredholm y col., 1994; Frenguelli y col., 2003), el cual parece actuar como un agente neuroprotector endógeno (de Mendonça y col., 2000; Fredholm y col., 2005a). En esta Memoria se ha demostrado que la exposición de las neuronas corticales a adenosina produce un efecto similar al observado en estas células cuando la presión parcial de oxígeno disminuía, aunque con algunas ligeras diferencias. En general, se podría decir que la adenosina mimetiza el efecto de la hipoxia a largos tiempos de exposición, sin embargo, a tiempos cortos de exposición el comportamiento de los receptores estudiados es diferente. El receptor A_1 , el más sensible a la presencia de adenosina y el que juega el papel principal en la neuroprotección mediada por este agente (Sebastião y col., 2001), es el que mayores diferencias presenta entre la aplicación de adenosina y la bajada de oxígeno. De hecho, los resultados sobre los niveles del receptor A_1 producidos por ambos tratamientos sólo se igualan en los experimentos a tiempos más prolongados (24 horas). Estas diferencias podrían ser debidas a la evolución con el tiempo de los niveles de adenosina durante la hipoxia. A pesar de haberse intentado, no se han podido calcular las concentraciones de adenosina a los distintos tiempos ensayados pero, a la vista de los resultados obtenidos, es razonable suponer que se produce un aumento gradual hasta alcanzar valores cercanos a 1 μM en el medio de cultivo. Sin embargo, el receptor A_{2A} no se comporta de manera diferente ante estas dos situaciones, observándose a todos los tiempos ensayados una regulación similar en ambos bloques de experimentos. Estos hechos experimentales concuerdan con la mayor

afinidad del receptor A_1 por la adenosina con respecto al A_{2A} y, por otro lado, apoyan la hipótesis de que el aumento del receptor A_1 sea neuroprotector, ya que esa facilidad que demuestra para ser modulado por los estímulos ensayados permitiría que la célula se adaptara rápidamente al nuevo entorno.

Se ha descrito con anterioridad por este grupo de investigación los procesos de trans-modulación existentes entre los receptores de adenosina y los receptores metabotrópicos de glutamato en cerebro (Albasanz y col., 2002b; León y col., 2008) y en corazón de rata (Iglesias y col., 2006). En la presente *Memoria* se ha demostrado que las variaciones detectadas en los receptores metabotrópicos de glutamato durante la disminución de la disponibilidad de oxígeno se corresponden con las provocadas por aumentos en la cantidad de adenosina en el medio de cultivo y son, por tanto, mediados por los receptores de adenosina. Estas variaciones detectadas ocurren en el mismo sentido que las observadas en cerebro de rata tras inyecciones subcutáneas de R-PIA (Albasanz y col., 2002b), aunque serían necesarios experimentos adicionales que desvelaran el mecanismo de control de los receptores de adenosina sobre los de glutamato en este modelo.

Durante la reoxigenación posterior a la hipoxia/isquemia ocurren fenómenos de muerte celular de vital importancia clínica. Los resultados descritos demuestran que durante la reoxigenación también ocurren procesos de modulación de la cantidad y la afinidad de los receptores estudiados en la presente *Memoria*. Para los receptores de adenosina se observa que 1 hora de reoxigenación produce en el receptor A_1 una disminución de los parámetros cinéticos observados, mientras que para el receptor A_{2A} no supone cambios destacables. Este resultado está de acuerdo con los argumentos expuestos anteriormente, por un lado los receptores A_1 son más susceptibles de ser regulados por la acción de la adenosina y, por tanto, también lo son a situaciones fisiológicas que producen variaciones en los niveles de este neuromodulador. Según esta hipótesis, sería el receptor A_1 el principal mediador de los efectos de la adenosina a nivel celular, siendo por tanto responsable de orquestar los cambios detectados a nivel del receptor A_{2A} . Para los receptores metabotrópicos la reoxigenación supone una variación adicional no observada durante los fenómenos de hipoxia moderada. En este caso, la variación en el número de receptores viene acompañada de aumentos en la afinidad de los mismos, se podría postular como el resultado de un mecanismo de compensación destinado a paliar la disminución en la excitabilidad neuronal que conlleva la pérdida de receptores metabotrópicos. Aunque poco se conoce de los mecanismos que gobiernan los procesos de reoxigenación, parece que la activación de los factores de transcripción *c-fos* y *c-jun* por las MAP quinasas controla la expresión génica durante la reoxigenación (Mizukami y col., 2000).

En condiciones fisiológicas, la familia de factores de transcripción CREB promueve la expresión de genes que contribuyen a la supervivencia neuronal (Dawson y Ginty, 2002), de hecho su deficiencia está directamente relacionada con degeneración neuronal (Mantamadiotis y col., 2002). Por tanto, la disminución en la viabilidad observada en este bloque de experimentos podría ser debida a la disminución de la transcripción de CREB y CREM que daría lugar a niveles menores de proteína. Esta afirmación se correlaciona con la observación de que en diferentes poblaciones neuronales la resistencia a procesos de hipoxia se producía por la fosforilación mantenida en el tiempo del factor CREB, mientras que en las neuronas no resistentes sólo se fosforilaba CREB de forma transitoria (revisado por Walton y Dragunow, 2000).

Los mayores reguladores de la homeostasia del oxígeno son los factores inducibles por hipoxia (Semenza, 2001), que se subdividen en tres familias: HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α . Mientras que HIF-1 α y HIF-2 α funcionan como factores de transcripción en sí con diferentes funciones esenciales para el desarrollo (Benizri y col., 2008), HIF-3 α parece ser un modulador negativo de los genes expresados en hipoxia, aunque sus funciones no están bien definidas hasta la fecha. La ausencia de variación en la expresión de HIF-1 α , así como el aumento en la expresión de HIF-3 α , hace razonable suponer que el efecto de la hipoxia moderada en estas células pueda ser debido a otros factores de transcripción distintos. Sin embargo, dado que la mayoría de los mecanismos de regulación de los factores de la familia HIF conocidos son post-transcripcionales (Benizri y col., 2008), la implicación de HIF-1 α y HIF-3 α en la modulación de la expresión génica en estos procesos no debe ser descartada.

V.3.2 En células C6 de glioma de rata.

A lo largo de este capítulo se ha demostrado que en las células C6 de glioma de rata expuestas a una presión parcial de oxígeno de un 5% ocurren fenómenos de modulación de los receptores metabotrópicos de glutamato, observándose aumentos en los parámetros cinéticos de estos receptores que han sido estudiados, que sólo se correlacionaban con aumentos en la expresión génica de mGlu₁ tras 24 horas de exposición. Los cambios en la expresión de los mGlu no se reflejan en la actividad PLC ensayada. En cuanto a los receptores de adenosina los receptores A₁ disminuyen y los A_{2A} aumentan, al contrario de lo que sucedía en cultivos neuronales, variando las respectivas constantes K_D en el mismo sentido. Estos cambios no se observaron a nivel del ARNm de estos receptores pero sí en los ensayos de la actividad AC en el caso del receptor A_{2A}. Se detectaron además variaciones en la expresión génica de los factores de transcripción CREB y CREM, los cuales disminuían durante la hipoxia moderada. Por último se demostró que la adenosina mimetizaba los efectos de la hipoxia y que la regulación observada en el caso de los receptores de adenosina estaba orquestada por el receptor A₁.

Al contrario de lo observado para neuronas corticales, en células C6 la hipoxia moderada no produce disminución alguna en la viabilidad celular, aunque estas células son sensibles a condiciones estrictas de privación de oxígeno y glucosa (Wang y Tang, 2007). Este fenómeno ha sido observado con anterioridad en células A549, derivadas de epiteliales de hígado, las cuales resistían 1,5% de O₂ durante 24 horas (Santore y col., 2002) y parece que se sustenta en la activación de la quinasa Akt, la cual inhibe la proteína pro-apoptótica Bad y favorece la acción del factor NF- κ B (Datta y col., 1997; Ozes y col., 1999). Además se ha descrito que, en algunos casos, la hipoxia favorece fenómenos de resistencia a apoptosis a través del factor IAP-2 (Dong y col., 2003). En células PC12 se observó que la hipoxia inducía cambios en enzimas claves del metabolismo del glutamato que producían una disminución del glutamato extracelular, lo cual podría proteger a estas células durante la hipoxia (Kobayashi y Millhorn, 2001).

Existen en la literatura estudios acerca del potencial terapéutico de los receptores mGlu, de hecho, se ha demostrado que el daño por anoxia se reduce en células endoteliales al emplear agonistas de los tres grupos

de receptores mGlu (Lin y Maiese, 2001) o que el empleo de agonistas del grupo I reduce la muerte celular en células granulares de cerebelo privadas de oxígeno y glucosa (Kalda y col, 2000). Recientemente se ha observado que, en cortes de hipocampo sometidos a privación de glucosa y oxígeno la activación de los mGlu del grupo I, y su acción a través de PI3K y Akt, resultaba neuroprotectora (Scartabelli y col., 2008). En este mismo sentido, se comentó en el apartado anterior el potencial neuroprotector de los agonistas de los grupos II y III de los mGlu. Con estos antecedentes bibliográficos se puede suponer que el aumento de los mGlu observado en células C6 sometidas a hipoxia moderada puede ser debido a un intento fisiológico de disminuir el daño celular producido por los procesos de privación de oxígeno, lo cual, por otro lado, explicaría la aparente insensibilidad de estas células, en lo que a su viabilidad se refiere, frente a la disminución de un factor vital como es la presión parcial de oxígeno.

Dado el aumento descrito en la expresión génica del gen codificante para el receptor mGlu₁, es razonable suponer que los niveles de proteína de este receptor deben estar aumentados en estos procesos. Sin embargo, los aumentos descritos en los niveles de los receptores mGlu, no pueden entenderse únicamente como un aumento del receptor mGlu₁, ya que la expresión génica no resulta modulada hasta tiempos prolongados de exposición a hipoxia moderada (24 horas). Por lo tanto, otros mecanismos de regulación deben estar implicados en el aumento detectado de los receptores mGlu.

Otro hecho experimental que corrobora esta hipótesis es la variación detectada en la afinidad de estos receptores. Las disminuciones en la afinidad detectadas podrían ser debidas, al menos, a 2 sucesos: por un lado que el aumento detectado de los receptores mGlu conlleve una variación en la presencia de los distintos subtipos en la membrana plasmática, como cada subtipo tiene su propia constante de afinidad, serían variaciones en las cantidades lo que podrían explicar la variación de la afinidad global; por otro lado, pueden darse en los receptores metabotrópicos procesos de dimerización, entre ellos mismos o con otros receptores de membrana, como consecuencia de las condiciones de hipoxia, que alteren la afinidad de los mismos por su ligando al tiempo que también modifican su funcionalidad.

La isoforma β_1 de la enzima PLC juega un papel importante en la transducción celular de señales de supervivencia (Lee y col., 2000b). Ha quedado demostrado que ni la actividad basal de la enzima PLC ni la capacidad de agonistas del grupo I de los receptores mGlu de estimularla varían en los experimentos desarrollados, a pesar del aumento observado en los receptores mGlu. Hay varias hipótesis que podrían explicar estos hechos. La primera de ellas es que las células C6 se comportaran de manera similar a las neuronas corticales durante la hipoxia moderada. Esta hipótesis fue discutida en el apartado anterior y no se repetirá aquí, sin embargo sí es necesario apuntar que el estudio realizado en células C6 fue menos exhaustivo que en neuronas corticales, por lo que hay menos datos experimentales que sustenten esta hipótesis. Otra posibilidad es que el sistema de los receptores mGlu del grupo I y la PLC no varíen, o no varíen lo suficiente, como para observarse diferencias significativas en la funcionalidad del sistema o bien existan variaciones a nivel de las proteínas G encargadas de conectar ambos sistemas que modifiquen la funcionalidad del sistema en su conjunto. Por último, podría ocurrir que no se observen diferencias debido a la baja actividad de la PLC en este tipo celular (tres veces menor que en neuronas corticales), lo que dificultaría su cuantificación.

Cualquiera de las hipótesis mencionadas anteriormente requeriría experimentos adicionales que la corroboraran.

En el estudio descrito se ha observado una pérdida de receptores A_1 a todos los tiempos de exposición ensayados. Los receptores A_1 normalmente se desensibilizan de forma más lenta que otros GPCR debido a su larga vida media (Hettinger y col., 1998). En este sentido, existen algunos trabajos que sugieren que la desensibilización neuronal de los receptores A_1 ocurre tras exposiciones a agonista a tiempos largos, incluso de días (Abbracchio y col., 1992; Fernández y col., 1996). Resultados similares se obtuvieron en tejido cerebral (Ruiz y col., 2005), y células granulares (Vendite y col., 1998) después de un tratamiento crónico con agonista. Además, la liberación de adenosina que ocurre durante la gestación disminuye los niveles de A_1 en cerebro de rata (León y col., 2004), incluso en ratas tratadas con cafeína y teofilina de manera crónica durante la gestación (León y col., 2002). Esta disminución se ha descrito también en otros tejidos, como cardiomiocitos sometidos a hipoxia hipobárica durante largos periodos (Kacimi y col., 1995). Recientemente Coelho y colaboradores (Coelho y col., 2006) han demostrado que 90 minutos de hipoxia son suficientes para observar la desensibilización e internalización de los receptores A_1 en hipocampo de rata, sin variación significativa en la afinidad de los mismos.

Las células neuronales responden a la hipoxia liberando adenosina tanto *in vivo* (Van Wylen y col., 1986; Phillis y col., 1987) como *in vitro* (Fredholm y col., 1994; Frenguelli y col., 2003). Por este motivo se considera que la adenosina actúa como un importante agente neuroprotector endógeno (de Mendonça y col., 2000; Fredholm y col., 2005). Recientemente se ha reconocido a la adenosina como un nuevo gliotransmisor, el cual se libera directamente por los astrocitos en situaciones patológicas (Martín y col., 2007). En general, la adenosina y los agonistas del receptor A_1 suelen ser neuroprotectores contra agentes tóxicos (Fredholm y col., 2005a), sin embargo, este efecto parece saturarse a elevados niveles extracelulares de adenosina durante la privación de glucosa y oxígeno (Lobner, 2002). La pérdida de receptores A_1 descrita aquí se mimetizó mediante la exposición de estas células a adenosina en condiciones normóxicas durante los mismos periodos de tiempo, lo que sugiere que este agonista es responsable, al menos, en parte, de la disminución de los niveles del receptor A_1 . El mismo razonamiento se puede emplear para la modulación de los receptores A_{2A} . Además, se comprobó que en presencia de adenosina desaminasa durante la hipoxia moderada no se observaban variaciones significativas de los receptores A_1 y A_{2A} .

Los valores de afinidad obtenidos en células normóxicas fueron ligeramente más elevados que los descritos por otros autores. Esta variación podría ser debida a diferencias entre los sistemas estudiados. Ligandos que funcionan bien en determinados sistemas pueden ser menos potentes, o incluso inactivos, cuando se emplean en sistemas distintos para los que fueron desarrollados. Un posible motivo que explicara este hecho son mutaciones puntuales en los sitios de reconocimiento del receptor que impidan el correcto reconocimiento del ligando (Da Settimo y col., 2004). De acuerdo con esto, se observaron diferencias de hasta tres órdenes de magnitud entre la afinidad obtenida para DPCPX y la obtenida para CPA en células CHO transfectadas con el receptor A_1 humano (Baker y Hill, 2007a). En este mismo estudio, se mostraba un valor de K_D para CPA en el rango de micromolar, lo que ilustra el amplio rango de valores de afinidad que se puede

encontrar cuando se estudian estos receptores. Además, los receptores de adenosina exhiben diferentes valores de EC_{50} en diferentes sistemas dependiendo del efecto medido. Por ejemplo, el efecto de NECA en células CHO transfectadas es mucho más potente a la hora de estimular la fosforilación de ERK1/2 ($EC_{50}=19$ nM) que a la hora de formar AMPc ($EC_{50} = 1,4 \mu M$) a través de los receptores A_{2B} (Schulte y Fredholm, 2000).

Nuestros resultados muestran un incremento en la afinidad del receptor A_1 , lo cual podría implicar modificaciones en los niveles de proteínas G y/o en la asociación de éstas con los receptores durante la hipoxia moderada. Aunque la afinidad de un receptor se ha considerado históricamente constante, dado que la composición química del receptor no varía, hay evidencias de que los receptores podrían tener múltiples sitios de unión e incluso de que un mismo receptor podría mostrar diferentes afinidades dependiendo de las condiciones experimentales (Baker y Hill, 2007b; Nelson y Challiss, 2007). Estas diferencias entre las medidas de las afinidades de los antagonistas han sido descritas en todos los receptores β -adrenérgicos humanos (Baker y Hill, 2007a, b). Aunque parece no ser este el caso de los receptores A_1 transfectados en células CHO (Baker y Hill, 2007a), cambios en la afinidad podrían ocurrir en los receptores de adenosina expresados endógenamente en las células C6 (Nelson y Challiss, 2007).

La hipoxia causa cambios en la actividad de diferentes quinasas y fosfatasa que determinan la afinidad de los receptores de adenosina (Kitakaze y col., 1996). La hipoxia causa además cambios en los lípidos de membrana, como los ácidos grasos insaturados en *cis* que podrían determinar las características de unión de los receptores A_1 y A_{2A} (Cunha y col., 2001b). Estos cambios en el receptor, la proteína G, el acoplamiento a la AC y los lípidos de los alrededores (Becher y McIlhinney, 2005) podrían ser responsables de la ausencia de variaciones en la capacidad del CHA de inhibir la actividad AC estimulada por forskolina a pesar de la disminución de los receptores A_1 . Además, sobre esta falta de efecto también podría influir el incremento en la afinidad de estos receptores durante la hipoxia. La actividad AC parece ser la vía principal de transducción mediada por los receptores A_1 en estas células, ya que ni CPA ni CHA fueron capaces de estimular la actividad PLC. Teniendo en cuenta los valores de K_D obtenidos en C6 se empleó una concentración de CHA elevada que asegurara el efecto máximo posible a la hora de testar la funcionalidad del receptor A_1 . Concentraciones similares de ligando se emplearon por Cordeux y colaboradores (Cordeux y col., 2004), los cuales usaron CPA 100 μM para inhibir la actividad AC en células CHO transfectadas con el receptor A_1 . Además, diferentes investigadores han empleado un amplio rango de concentraciones de los ligandos de los receptores de adenosina en diferentes sistemas (de Mendonça y col., 2000), lo que sugiere que cada ensayo ha de ser optimizado en cada sistema celular (Nelson y Challiss, 2007). Con respecto a los antagonistas, aunque las concentraciones usadas puedan parecer elevadas, son similares a las empleadas en cultivos gliales, en los que ZM241385 se empleó en el rango de micromolar para bloquear la estimulación de CGS21680 (Küst y col., 1999; Saura y col., 2005).

Hay algunos trabajos que demuestran que la expresión génica de receptores de superficie, como los receptores α y β -adrenérgicos, es regulada por efecto de la hipoxia (Li y col., 1995, 1996). Una de las primeras evidencias del aumento de los niveles del receptor A_{2A} , a nivel de proteína y de ARNm, durante la hipoxia la proporcionaron Kobayashi y Millhorn (Kobayashi y Millhorn, 1999) en células PC12. En estas células la

activación de los receptores A_{2A} disminuye la excitabilidad de la membrana, al aumentar la salida de K⁺ e inhibir la entrada de Ca²⁺ (Kobayashi y col., 1998). Los niveles de hipoxia empleados por Kobayashi son indicativos de que la regulación del receptor A_{2A} podría estar implicada no sólo en procesos de hipoxia severa o isquemia sino también en procesos fisiológicos como la adaptación a la altitud. Por otro lado, el análisis de la secuencia del promotor del receptor A_{2B} demostró que existía una región funcional de respuesta a hipoxia que incluía un sitio de unión para el factor HIF (Kong y col., 2006). Sin embargo, los datos que se han mostrado aquí indican que la hipoxia moderada no afecta a la expresión génica de los receptores de adenosina que se expresan de manera endógena en las células C6 (Castillo y col., 2007). Por tanto, la regulación observada para los receptores A₁ y A_{2A} debe estar relacionada con fenómenos de tráfico intracelular (Ruiz y col., 1996; Escriche y col., 2003; Becher y McIlhinney, 2005).

El factor de transcripción CREB desempeña un papel importante en la transcripción basal del gen A_{2A} (Chiang y col., 2005). La expresión génica de los factores de transcripción CREB y CREM está significativamente disminuida durante la hipoxia en células C6, y podría estar implicada en la modulación de los receptores observada o la de otros genes diana en estas células.

La expresión génica durante la hipoxia está controlada por la familia de factores de transcripción conocida como factores inducibles por hipoxia (HIF) (Semenza, 2001). HIF-1 α está altamente regulado por la presión parcial de oxígeno (Wang y col., 1995), sin embargo, HIF-3 α se relaciona con la disminución de la señal desatada por la hipoxia al considerarse un inhibidor de HIF-1 α (Makino y col., 2002). La ausencia de efecto de la hipoxia en HIF-1 α en C6 podría justificar en parte la falta de alteración de la viabilidad celular observada durante la hipoxia. Aunque HIF-1 α parece no estar alterado, la disminución aparente de la expresión de HIF-3 α podría suponer una menor inhibición de la actividad de HIF-1 α durante la hipoxia moderada en células C6.

Los gliomas son los tumores más comunes en el SNC. Contienen múltiples regiones sensibles a la hipoxia que exhiben una elevada actividad del factor HIF, que tiene como resultado el aumento en la expresión de muchas dianas de HIF y contribuye al crecimiento y a la elevada vascularización de estos tumores (Kaur y col., 2005). En la mayoría de los cánceres, la expresión de HIF-1 α parece estar asociada con el progreso del tumor y su desarrollo. Además, parece que HIF-1 media la resistencia a radioterapia (Aebbersold y col., 2001) y quimioterapia (Unruh y col., 2003) de las células cancerígenas en hipoxia. En modelos experimentales la eliminación de HIF-1 impide el crecimiento del tumor y los fenómenos angiogénicos (Ryan y Johnson, 1998) y su inhibición mejora la respuesta a la quimioterapia y a la radioterapia (Quintero y col., 2004). Por otro lado, los receptores de adenosina aumentan los niveles de factores angiogénicos no sólo en condiciones normóxicas, sino también bajo los efectos de la hipoxia. Se ha descrito que la adenosina coopera con la hipoxia para estimular la secreción de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e induce la secreción de factores angiogénicos adicionales como, por ejemplo, la interleuquina 8 (IL-8), que no se estimulan únicamente por la hipoxia. Estos factores, secretados en respuesta a ambos estímulos podrían promover la neovascularización y, en última instancia, la adecuada oxigenación del tejido (Ryzhov y col., 2007). Cuando las células C6 se implantaron en cerebros de rata, la expresión del receptor A₁ en los tumores generados era dependiente del volumen del tumor e independiente del tiempo de desarrollo del mismo (Dehnhardt y col., 2007). El hecho

experimental de que en este estudio la expresión de HIF-1 α no aumentara en células C6 sometidas a hipoxia, mientras que los receptores de adenosina eran regulados de forma específica por efecto de la adenosina abre la puerta al empleo de ligandos con efecto sobre los receptores de adenosina como agentes terapéuticos durante la hipoxia y, tal vez, para enfermedades tumorales.

V.4. Muerte celular inducida por el péptido amiloide.

V.4.1 En cultivos primarios de neuronas de corteza.

Los resultados expuestos en la presente *Memoria* demuestran los efectos nocivos de la exposición de neuronas corticales al fragmento 25-35 del péptido amiloide (βA_{25-35}). Este fragmento ha sido ampliamente utilizado en numerosos trabajos de investigación, en los que, al igual que en esta *Memoria*, se comprobaron que los efectos ejercidos por este péptido eran similares a los observados tras el empleo de βA_{1-42} (Pike y col., 1993; Iversen y col., 1995). Entre los efectos observados destacan una marcada disminución de la viabilidad celular, que depende tanto del tiempo de exposición como de la cantidad de βA_{25-35} que se empleó en los ensayos, y una activación de la caspasa 3, tanto a nivel de la expresión génica como a nivel de su actividad enzimática. Estos resultados sugieren que la muerte celular observada se produce a través de mecanismos apoptóticos, los cuales convergen en la activación de la caspasa 3, una caspasa efectora que, una vez activada, procesará otros sustratos que mediarán en la muerte celular por apoptosis, y que se relaciona con, al menos, parte de la muerte neuronal observada durante el progreso de la enfermedad de Alzheimer (revisado por Wellington y Hayden, 2000). La toxicidad del fragmento 25-35 ya había sido demostrada previamente en neuronas corticales *in vitro* por el método del MTT (Ueda y col., 1997), así como también se conocía que la activación de la caspasa 3 era responsable de parte de la muerte celular observada *in vitro* como consecuencia de la exposición de neuronas corticales a βA_{25-35} (Harada y Sugimoto, 1999). Sin embargo, se ha observado también que el efecto tóxico del péptido amiloide depende de la concentración a la que se emplee. Se ha establecido que a elevadas concentraciones, como las empleadas en la presente *Memoria*, el péptido amiloide ejerce un efecto tóxico, mientras que a concentraciones más bajas, que podrían considerarse fisiológicas, algunos autores han observado efectos tróficos, antioxidantes, antiapoptóticos o neuroprotectores (Schaeffer y col., 2008; revisado por Atwood y col., 2003).

En la actualidad se está considerando el papel que pueden desarrollar los receptores metabotrópicos de glutamato en la patogénesis de ciertas enfermedades neurodegenerativas. En el caso de la enfermedad de Alzheimer los receptores metabotrópicos de glutamato podrían contribuir a la patogénesis de algunas deficiencias neurológicas y, además, serían capaces de regular la vulnerabilidad neuronal frente a estrés tóxico. Los resultados aquí mostrados demuestran que la exposición a βA_{25-35} produce un incremento del número de receptores metabotrópicos de glutamato en la superficie celular acompañado de un incremento en la afinidad de los mismos por su ligando. Además se ha comprobado por inmunocitoquímica que son responsables de este aumento, al menos, los receptores mGlu₁ y mGlu₅, los cuales aumentan su expresión tras la exposición a

βA_{25-35} , mientras que los subtipos $mGlu_{2,3}$ disminuyen, observándose, por tanto, procesos de regulación diferencial de los distintos subtipos de los receptores metabotrópicos de glutamato. Por otro lado, se ha comprobado la funcionalidad del sistema mediante ensayos de actividad enzimática, y se ha observado que la capacidad de los receptores metabotrópicos del grupo I de estimular la actividad PLC resulta disminuida tras la exposición a βA_{25-35} , mientras que la de los del grupo III y II para inhibir la actividad AC resulta aumentada e inalterada, respectivamente.

El efecto de agonistas y antagonistas de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I sobre la neurotoxicidad ejercida por el péptido amiloide ha resultado, hasta la fecha, controvertido. El primer trabajo disponible en la bibliografía acerca del empleo de ligandos para los receptores metabotrópicos de glutamato en presencia del péptido βA_{25-35} afirmaba que la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato, empleando ligandos poco específicos, protegía a las neuronas corticales del daño producido por la exposición al péptido amiloide, aunque al realizar los mismos experimentos en neuronas granulares sólo se observó efecto neuroprotector por activación de los receptores del grupo III (Copani y col., 1995). Sin embargo, este mismo grupo publicó años después que en neuronas corticales el bloqueo del subtipo 5 resultaba neuroprotector en las mismas condiciones (Bruno y col., 2000b). La controversia acerca del efecto de estos ligandos se extiende a otros trabajos, por ejemplo Allen y colaboradores propusieron que el empleo de antagonistas de los receptores metabotrópicos del grupo I exacerbaba el daño producido por la exposición al péptido amiloide en neuronas granulares (Allen y col., 1999), mientras que Pizzi y colaboradores demostraron que en neuronas corticales y en células de neuroblastoma SK-N-SH la activación del subtipo 5, en contra de lo que proponían Bruno y colaboradores, resultaba neuroprotectora frente al daño producido por el péptido amiloide mediante la activación del factor NF- κ B (Pizzi y col., 2005). Estos autores sostienen que, a pesar de que la activación de los receptores del grupo I es excitadora, existen indicios que apoyan la idea de que la activación tónica mismos induce la desensibilización de su actividad facilitadora de la actividad neuronal transformándola en una acción inhibidora de la actividad y, por tanto, neuroprotectora (Herrero y col., 1998; Bruno y col., 2001). Debido a estos precedentes bibliográficos no es fácil predecir, sin la realización de experimentos adicionales, si los procesos de regulación observados en los receptores metabotrópicos de glutamato son resultado de una respuesta a favor de la supervivencia celular o bien es el resultado de una situación tóxica. En principio, los resultados observados en humanos por este mismo grupo de investigación apoyan la primera hipótesis, ya que, en corteza de pacientes de Alzheimer se observó una disminución global de los receptores metabotrópicos de glutamato, quedando demostrado que el subtipo 1 era, en parte, responsable de esa disminución observada (Albasanz y col., 2005). No obstante, existen otros indicios no relacionados con el empleo de agonistas y antagonistas en modelos de neuroprotección sino, más bien, con la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer, estos trabajos se expondrán a continuación y aclararán el papel neuroprotector de los receptores metabotrópicos del grupo I en este modelo.

Los receptores metabotrópicos de glutamato se han relacionado con los dos principales rasgos anatomopatológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer: los ovillos neurofibrilares, formados por agregados de proteína tau hiperfosforilada, y las placas neuríticas, acúmulos del péptido βA_{1-42} . En primer lugar

se ha demostrado que en neuronas NT2-N la activación de los receptores metabotrópicos del grupo I bloqueaba el aumento de los niveles de proteína tau observado en estas células tras un pulso con NMDA (Paterlini y col., 1998), resultando su activación, por tanto, neuroprotectora. Por otro lado, la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato también ha sido relacionada con el procesamiento de la proteína APP a formas no amiloidogénicas. Así, se demostró que en neuronas hipocampales y astrocitos corticales empleando ACPD, agonista de los grupos I y II, se favorecía el procesamiento de APP en formas no amiloidogénicas (sAPP) (Lee y col., 1996). Lo mismo se demostró en neuronas NT2-N empleando agonistas específicos del grupo I (Jolly-Tornetta y col., 1998) y en cortes de hipocampo y corteza de cerebro de rata al activar los grupos I y II (Ulus y Wurtman, 1997). Estas referencias bibliográficas apoyan la hipótesis de que el aumento observado en los receptores metabotrópicos del grupo I como consecuencia de la exposición al péptido amiloide pudieran ser resultado de una respuesta celular cuyo objeto fuera disminuir la toxicidad producida por dicho péptido. En este sentido, se ha descrito por el grupo de investigación en el que se desarrolló esta *Memoria* que en cerebros de pacientes de Alzheimer ocurre una pérdida gradual de receptores mGlu (Albasanz y col., 2005).

Se ha descrito en la Demencia con cuerpos de Lewy que existe una disminución de los niveles de proteína PLC β_1 como consecuencia de su asociación con la α -sinucleína (Dalfó y col., 2004), sin embargo, estas variaciones no se observaron al analizar los niveles de PLC β_1 en cerebros de pacientes de Alzheimer (Albasanz y col., 2005). No obstante, los efectos descritos en la presente *Memoria*, demuestran que la cantidad de PLC β_1 disponible en neuronas corticales es menor tras la exposición de las mismas al péptido amiloide, lo que produciría, a su vez, una disminución de la funcionalidad de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I en este sistema, a pesar de su aumento en número. Este resultado es distinto al observado anteriormente por este grupo (Albasanz y col., 2005), sin embargo, en ambos casos, el resultado sería una disminución de la funcionalidad del sistema mGlu I/PLC β_1 y sería razonable suponer que la disminución de la proteína PLC β_1 descrita en esta *Memoria* podría ser resultado de un mecanismo de protección celular destinado a disminuir los niveles de Ca²⁺ intracelular, aumentados como consecuencia de la exposición al péptido amiloide (revisado por Mattson y Chan, 2003). Por otro lado, aumentos en los niveles de Ca²⁺ intracelular se han relacionado con un aumento de la generación de péptido amiloide (Querfurth y col., 1997) así como de la hiperfosforilación de la proteína tau (Mattson y col., 1991). Un fenómeno que corrobora esta hipótesis es que se ha demostrado en células de neuroblastoma SH-SY5Y que las mutaciones familiares en la presenilina 1 favorecen el aumento de calcio intracelular al aumentar la activación basal de PLC, lo que, en definitiva, sensibiliza a la célula frente a estímulos apoptóticos (Cedazo-Minguez y col., 2002).

El papel de los receptores metabotrópicos del grupo II en la enfermedad de Alzheimer es todavía controvertido. Se ha propuesto que durante el desarrollo de esta enfermedad se producen disfunciones en el transporte y la liberación de glutamato que desembocan en un aumento de la concentración extracelular del mismo. Por un lado, se han detectado disfunciones en los transportadores de glutamato (Scott y col., 2002; Jacob y col., 2007; Duerson y col., 2008), así como una disminución en la captura del mismo por parte de astrocitos expuestos al péptido amiloide (Matos y col., 2008). Por otro lado, se ha demostrado la capacidad del

péptido amiloide para estimular la liberación de glutamato (Kabogo y col., 2008). Por tanto, es razonable suponer que la activación de los receptores del grupo II y del grupo III, que inhiben de manera presináptica la liberación de glutamato, resulte neuroprotectora, como ya se había propuesto previamente en la literatura (Bruno y col., 1995b). Sin embargo, se ha observado de manera específica en neuronas hipocámpales que se produce un aumento de los receptores mGlu₂ durante la enfermedad de Alzheimer que podría suponer un mecanismo de protección para inhibir la liberación de glutamato y que está directamente relacionado con la hiperfosforilación de tau por la quinasa ERK (Lee y col., 2004a). Sin embargo, estos mismos autores proponen que se revise el hecho de que la fosforilación de tau para formar filamentos sea nocivo (Cash y col., 2003), ya que han observado que la activación de ERK a través de mGlu₂ es neuroprotectora frente al estrés oxidativo (Lee y col., 2009). Por tanto, resulta difícil predecir el papel que puede desempeñar esta regulación a la baja de los receptores metabotrópicos del grupo II en la superficie neuronal y para hacerlo con precisión se necesitarían experimentos adicionales que arrojen luz sobre el papel de estos receptores en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35} , si bien es cierto que su funcionalidad no resulta alterada en este modelo experimental.

En lo que se refiere a los receptores metabotrópicos del grupo III la mayor inhibición de la AC detectada por agonistas selectivos sugiere un aumento de estos receptores como consecuencia de la exposición a βA_{25-35} , lo que concuerda con la reducción de la liberación de glutamato expuesta en el párrafo anterior. Además, ya se demostró que los agonistas de los receptores metabotrópicos de los grupos II y III ejercían un efecto neuroprotector frente al daño celular *in vitro* originado por la exposición a βA_{25-35} debido a su capacidad para disminuir la conductancia de la membrana a Ca^{2+} (Copani y col., 1995). Más recientemente ha sido demostrada la acción neuroprotectora de agonistas del subtipo mGlu₄ frente al daño producido por βA en cultivos mixtos de neuronas de corteza de ratón (Maj y col., 2003). Por último, se ha sugerido que el péptido amiloide podría ser capaz de activar la PKA, la cual llegaría a activar la ruta de las caspasas (Martínez-Velázquez y col., 2007). Un corolario de esta hipótesis es que los agonistas de los grupos II y III, que disminuyen la cantidad de AMPc, deberían ejercer efectos beneficiosos sobre la viabilidad celular. Esto ha sido demostrado recientemente en el caso de los agonistas del grupo III, cuyo uso en neuronas corticales las protegía frente al daño celular producido por la exposición al péptido amiloide mediante el bloqueo de las vías de las caspasas (Zhao y col., 2008). Debido a todos estos antecedentes es posible suponer que un aumento en los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo III en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35} tendría como objetivo fomentar la supervivencia celular frente a un agente tóxico.

En cuanto a los receptores de adenosina, se ha expuesto en la presente *Memoria* que en neuronas corticales expuestas a βA_{25-35} se observa un aumento de los receptores A₁ y A_{2A} con respecto a las neuronas controles, este aumento se observó a nivel de proteína en la membrana plasmática y a nivel de ARNm. En ensayos funcionales se observó una sensibilización de la vía de señalización principal del receptor A₁ tras 24 horas de exposición, sin variación de la funcionalidad del receptor A_{2A}. La diferencia observada entre ambos receptores en estas condiciones radica en que, si bien se produce un aumento de ambos, el primero en producirse es el del receptor A₁, tras 24 horas de exposición, mientras que se necesitaron 24 horas adicionales

de exposición para detectar el aumento en los niveles de receptor A_{2A} . Dado que tras 24 horas de exposición los niveles de ARNm de los correspondientes genes ya estaban aumentados, mecanismos de regulación post-transcripcionales pueden ser los responsables de los fenómenos observados. No obstante, los aumentos observados en el receptor A_{2A} tras las 48 horas de exposición pueden ser debidos al incremento en su expresión génica, dado que ésta aumenta de manera significativa con respecto a los valores observados a las 24 horas. La regulación de los receptores de adenosina con el tiempo de exposición al péptido amiloide puede estar relacionada con la función de estos receptores en condiciones patológicas, como se intentará discutir a continuación.

El papel neuroprotector de los agonistas de los receptores A_1 ya ha sido expuesto con anterioridad en la presente *Memoria*, basado, por lo general, en la capacidad del receptor A_1 de bloquear la entrada de calcio, inhibiendo así la liberación de glutamato y evitando la sobre-excitación post-sináptica. Previamente se había observado que se produce un aumento de los receptores A_1 en cerebros de pacientes de Alzheimer (Angulo y col., 2003; Albasanz y col., 2008), aunque estos resultados contradecían trabajos previos realizados con técnicas menos sensibles (Ulas y col., 1993; Deckert y col., 1998). Por otro lado, en ratones transgénicos portadores de la mutación sueca de la proteína APP se observaron niveles elevados de los receptores A_1 en corteza acompañados por un descenso en los niveles de adenosina (Arendash y col., 2006). En este caso particular, los bajos niveles de adenosina podrían explicar los niveles elevados del receptor A_1 como parte de un modelo de regulación clásica de los GPCR. Además, Angulo y colaboradores demostraron que, en células SH-SY5Y de neuroblastoma, el empleo de agonistas del receptor A_1 desencadenaban procesos encaminados a aminorar los efectos producidos por los dos rasgos anatomopatológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer (Angulo y col., 2003). Por un lado, la activación de los receptores A_1 fomentaba la transformación no amiloidogénica del péptido APP, por otro, facilitaba la translocación de la proteína tau fosforilada al citoesqueleto, donde es menos probable que forme estructuras neurodegenerativas (Mandelkow y col., 1996). Estos precedentes convergen en el hecho de que la presencia de un número elevado de receptores A_1 en neuronas en proceso de degeneración como consecuencia de la exposición al péptido amiloide debe ser neuroprotectora debido a los efectos anteriormente discutidos.

El caso de los receptores A_{2A} es más complejo. Por un lado existe controversia acerca de la localización de estos receptores en otras regiones aparte del estriado y, sin embargo, este receptor ha sido detectado con éxito en hipocampo y corteza de rata (Cunha y col., 1996), células gliales de rata (Castillo y col., 2007) y, mediante distintas técnicas, en varias regiones cerebrales del cerebro humano incluida la corteza (Svenningsson y col., 1997; Ishiwata y col., 2005; Albasanz y col., 2008). Por otro lado, no existen indicios de que en este modelo de neurodegeneración la activación de los receptores A_{2A} pudiera resultar neuroprotectora, más bien al contrario, dado que su activación produce la liberación de glutamato facilitando la excitabilidad neuronal, lo más probable es que sea el bloqueo de estos receptores lo que resulte neuroprotector. En este sentido existen varios trabajos que apoyan esta hipótesis. Por un lado, el empleo de antagonistas específicos del receptor A_{2A} protege de la neurotoxicidad inducida por la exposición al fragmento 25-35 del péptido amiloide en neuronas granulares (Dall'Igna y col., 2003). Por otro lado, se ha descrito que la

cafeína y antagonistas del receptor A_{2A} bloqueaban los déficits cognitivos observados en ratas a las que se les administraba βA_{25-35} de forma intracerebroventricular (Dall'Igna y col., 2007). Experimentos adicionales demostrarían que el bloqueo de estos receptores no afecta a las alteraciones generales de la memoria (como las observadas por ejemplo mediante el empleo de bloqueantes del sistema colinérgico como la escopolamina) sino que su acción se restringe a condiciones neurodegenerativas en las que se produce deterioro de la memoria (Cunha y col., 2008). En cuanto a los niveles de receptor, se ha descrito que en la corteza cerebral de enfermos de Alzheimer se produce un aumento de los niveles de A_{2A} acompañado de una sensibilización de su principal vía de señalización (Albasanz y col., 2008). También se ha observado un aumento de la densidad del receptor A_{2A} en hipocampo de ratones transgénicos de la proteína APP (Arendash y col., 2006) así en hipocampo de pacientes de Alzheimer (Angulo y col., 2003). Si unimos los aumentos observados en los niveles del receptor A_{2A} con las propiedades neuroprotectoras de los antagonistas de estos receptores se puede concluir que el aumento del receptor A_{2A} observado en neuronas corticales como consecuencia de una exposición prolongada al péptido amiloide es un rasgo patológico originado por unas condiciones de neurotoxicidad elevadas aunque, como se ha expuesto, la respuesta celular desencadenada a tiempos más cortos sea el aumento del receptor A_1 , cuyo carácter neuroprotector ya ha sido discutido con anterioridad.

Ya se ha comentado en la presente *Memoria* la relación entre los factores de transcripción CREB y CREM y la supervivencia celular. En los resultados presentados se observa una disminución en la transcripción de estos factores tras la exposición al péptido amiloide. Según estudios previos, existe una fosforilación reducida de CREB en cerebros de pacientes de Alzheimer (Yamamoto-Sasaki y col., 1999) así como en ratones transgénicos que expresaban APP humano (Dineley y col., 2001), la cual era producida por deficiencias en la activación de la quinasa ERK como consecuencia de la oligomerización del péptido amiloide (Ma y col., 2007). De hecho, se ha planteado que la recuperación de la fosforilación de CREB pueda ser una señal de que la aplicación de un determinado compuesto sea neuroprotector frente a la acción tóxica del péptido amiloide (Xu y col., 2007b). Debido a estas evidencias, se ha propuesto que compuestos capaces de aumentar los niveles de AMPc podrían tener resultados cognitivos positivos en la enfermedad de Alzheimer así como en otras enfermedades neurológicas (revisado por De Felice y col., 2007). Estos antecedentes bibliográficos corroboran de forma indirecta los resultados aquí presentados ya que, aunque no existen datos previos acerca de los niveles de ARNm de estos factores, es razonable suponer que un nivel inferior de expresión de estos factores supondrá una activación menor de los mismos al estar disponible menos cantidad de proteína.

V.4.2 En células C6 de glioma de rata.

En esta sección se discutirá acerca de los resultados obtenidos al exponer las células C6 de glioma de rata al fragmento 25-35 del péptido amiloide. Como se ha mostrado en *Resultados*, las células C6 expuestas a βA_{25-35} sufren procesos de muerte celular apoptótica dependientes de la concentración y del tiempo de exposición. No obstante, se observa que, por encima de las 6 horas de exposición, el daño producido por βA_{25-35} no aumenta sino que se mantiene. Se ha demostrado que los astrocitos son capaces de unir e internalizar el péptido βA_{1-42} , siendo esta capacidad mayor en astrocitos jóvenes que en adultos (Nielsen y col.,

2008), lo que podría explicar esta parcial invulnerabilidad de algunas células gliales frente a la exposición al péptido amiloide (Takadera y col., 1993). Las células gliales mantienen la plasticidad neuronal y fomentan la recuperación funcional del cerebro frente a enfermedades o agentes tóxicos, por estos motivos es importante el estudio de las células gliales expuestas al péptido amiloide, ya que disfunciones de estas células pueden promover procesos de neurodegeneración que darían lugar a los déficits cognitivos observados en la enfermedad de Alzheimer.

Ha quedado demostrado que se produce una regulación diferencial de los receptores metabotrópicos de glutamato en las células C6 de glioma de rata expuestas al péptido amiloide. En concreto, se ha observado, mediante ensayos de unión de radioligandos, un aumento global de los receptores metabotrópicos, el cual podría atribuirse al aumento en la densidad de los receptores metabotrópicos del grupo III, ya que, mediante inmunofluorescencia, se ha observado una disminución del subtipo mGlu₁ sin variación de los receptores mGlu₅ y mGlu_{2,3}. Ha sido comentado con anterioridad la controversia existente acerca del empleo de agonistas o antagonistas de los receptores metabotrópicos del grupo I en modelos de neuroprotección frente a la exposición del péptido amiloide *in vitro*. Si suponemos que los efectos observados a nivel de la expresión de los receptores metabotrópicos de glutamato son consecuencia de una respuesta celular destinada a atenuar la toxicidad producida por la exposición al péptido amiloide, es posible suponer que la disminución en los niveles de mGlu₁ así como un posible aumento en los niveles de los receptores metabotrópicos del grupo III resulten neuroprotectores frente a βA_{25-35} .

Si se cumple esta hipótesis el empleo de antagonistas de los receptores metabotrópicos de glutamato del subtipo 1 debería resultar neuroprotector. Se comentó en el apartado anterior el carácter neuroprotector que encontraban algunos autores en el empleo de antagonistas de los receptores metabotrópicos del grupo I en varios modelos de toxicidad neuronal por exposición al péptido amiloide. A la luz de estos trabajos sería posible también especular que la disminución observada en los receptores mGlu₁ podría considerarse como un movimiento defensivo ante una posible sobre-estimulación del sistema de liberación de calcio del retículo endoplásmico mediado por estos receptores. Para corroborar esa hipótesis deberían comprobarse los mecanismos por los cuales disminuye la expresión de los receptores mGlu₁ en la membrana plasmática pero resulta inalterada la de los mGlu₅. Sin embargo, se ha descrito también que la estimulación de los receptores metabotrópicos del grupo I, o la estimulación de cualquier receptor metabotrópico (Lee y Wurtman, 1997), fomenta el procesamiento no amiloidogénico de la proteína APP, dando lugar a su forma soluble, APPs (Lee y col., 1995), la cual, a su vez, aumenta el transporte de glutamato al interior del astrocito (Masliah y col., 1998).

Por otro lado no es posible descartar que los efectos observados sobre el receptor mGlu₁ sean debidos a un proceso de regulación a la baja de un GPCR como consecuencia de una exposición excesiva a su ligando. Elevados niveles de glutamato podrían alcanzarse de varias maneras. Por un lado, por las disfunciones en los transportadores de glutamato que aparecen como consecuencia de la exposición al péptido amiloide. En este sentido, se ha comentado con anterioridad las disfunciones observadas en el transportador EAAC1, transportador de glutamato presente en las células C6, en pacientes de Alzheimer (Duerson y col., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que este transportador se inhibe por la presencia del péptido amiloide (Gu y col.,

2004) y que neuronas deficientes en presenilina 1 presentan una capacidad disminuida de recapturar glutamato, acompañada por una disminución de la presencia en membrana plasmática de este transportador (Yang y col., 2004). Estos antecedentes permiten sugerir que en estas condiciones en las células C6 podrían encontrarse elevados niveles de glutamato, los cuales podrían ser los responsables de la regulación a la baja del receptor mGlu₁ por un mecanismo clásico de internalización en vesículas de clatrina, como previamente ya se ha sugerido por este grupo de investigación (Albasanz y col., 2002a). No obstante, al igual que en la hipótesis anterior, quedaría abierta la pregunta de qué mecanismos disminuyen la presencia en membrana del receptor mGlu₁ pero no del mGlu₅ ni del mGlu_{2,3}. Esta hipótesis se sostiene además sobre los resultados observados en células C6 expuestas a L-Glu, donde se observaba una disminución de la densidad de los receptores mGlu₁ en membrana pero no del mGlu₅.

Al igual que en el apartado anterior, en células C6 el aumento detectado en los niveles de todos los receptores metabotrópicos podría ser atribuible a un aumento en los receptores del grupo III en membrana plasmática. Si suponemos que ese aumento es consecuencia de una respuesta celular destinada a aminorar la toxicidad sufrida como consecuencia de la exposición al péptido amiloide es razonable suponer que el empleo de agonistas de estos receptores puede resultar beneficioso para la supervivencia celular en estas condiciones. Ya fueron comentados en el apartado anterior algunos trabajos que exponían los efectos neuroprotectores observados en distintos sistemas al emplear agonistas de estos receptores. Además de esos trabajos, se ha descrito que la activación de los receptores metabotrópicos del grupo III reducía la liberación de neurotoxinas por parte de la microglía activada como consecuencia de la exposición a βA_{25-35} u otros agentes (Taylor y col., 2003), lo que, en definitiva, disminuía la toxicidad generada por la glía activada (Wu y col., 2000). No obstante, también es posible encontrar trabajos contradictorios en este campo. Así, algunos autores proponen que los efectos neuroprotectores de la activación de los receptores metabotrópicos del grupo III no requieren de un componente glial, basándose en la incapacidad de L-AP4 de disminuir la toxicidad por NMDA en cultivos mixtos al ser aplicado el agonista 10 minutos antes que el agente tóxico, aunque, como los propios autores reconocen, ello dependía de las condiciones de aplicación (Bruno y col., 1997). Además, estos mismos autores han publicado que en cultivos mixtos la activación de mGlu₄, incluido en el grupo III, reducía la toxicidad observada por βA_{25-35} y NMDA, al igual que lo hacía el bloqueo del receptor mGlu₁ (Maj y col., 2003). Por tanto parece que existen los suficientes antecedentes bibliográficos para suponer que si el empleo de agonistas de los receptores metabotrópicos del grupo III resulta neuroprotector en varios modelos de neurotoxicidad, el aumento de la presencia de estos receptores en la membrana plasmática puede ser igualmente neuroprotector.

Los resultados obtenidos en los estudios de los receptores de adenosina en células C6 expuestas al péptido amiloide son similares a los observados y discutidos previamente en neuronas. De nuevo se observa un aumento de los receptores A₁ y A_{2A} de adenosina tanto a nivel de la expresión génica como a nivel de proteína en la membrana plasmática. Aumentos también detectados en la enfermedad de Alzheimer, como se comentó con anterioridad (Albasanz y col., 2008). En estas células encontramos además una particularidad, los incrementos observados en la cantidad de receptor A_{2A} en este modelo de neurotoxicidad van disminuyendo según aumenta el tiempo de exposición al péptido amiloide. Como ya se propuso en el apartado anterior, los

antecedentes bibliográficos disponibles adjudican un papel neuroprotector a la activación del receptor A_1 y al bloqueo del A_{2A} . En este apartado se aportará un dato adicional, un estudio que relaciona de forma directa los niveles de AMPc y la transcripción de APP en astrocitos (Lee y col., 1997). Según este trabajo, la estimulación de la AC para incrementar los niveles de AMPc tenía como consecuencia el aumento de la cantidad celular de proteína APP que se relacionaba con un aumento de su expresión génica. Dada la relación existente entre la proteína APP, el péptido amiloide y la enfermedad de Alzheimer, los autores sugerían que esta sobreexpresión de APP podría incidir en el desarrollo de la enfermedad. Enfocado a los resultados aquí presentados, esta investigación se ajusta con la hipótesis de que la activación de los receptores A_1 , acoplados de forma inhibitoria a la AC, y el bloqueo de los A_{2A} , acoplados de forma estimuladora a dicha enzima, resulten beneficiosos para la supervivencia celular en este modelo de neurotoxicidad. Por otro lado, si suponemos que el aumento de los receptores A_{2A} , como consecuencia de la exposición a βA_{25-35} , es fruto de un proceso anómalo o patológico, se observa que justo cuando los niveles de este receptor son más elevados es cuando las células C6 son más vulnerables a la toxicidad por βA_{25-35} , mientras que, según descende la densidad del receptor A_{2A} en la superficie celular, el efecto tóxico del péptido no aumenta sino que parece estabilizarse, lo que corroboraría el papel nocivo de la activación del receptor A_{2A} . Aún así, la teoría aquí expuesta sólo demuestra que los receptores de adenosina están relacionados con la producción del precursor del péptido amiloide en astrocitos pero, dado que las células C6 también producen esta proteína y son capaces de procesarla hasta llegar al péptido amiloide (Morato y Mayor, 1993), es posible que exista una relación más directa entre los receptores estudiados en la presente *Memoria* y el procesamiento del péptido amiloide en células C6.

En cuanto a los efectos observados sobre la transcripción de los factores CREB y CREM en células C6 expuestas al péptido amiloide, éstos dependen del tiempo de exposición a βA_{25-35} , observándose a tiempos cortos una disminución de su expresión, la cual aumenta con el tiempo para volver a la situación basal de expresión a las 48 horas. Existe un estudio previo en células C6 que demuestra que la actividad del factor CREB aumenta como consecuencia de la exposición a βA_{25-35} durante 18 horas (Ayasolla y col., 2004). Aunque el tiempo de ensayo no coincide con los empleados aquí, corrobora parcialmente los resultados presentados. Dada la relación entre la función de estos factores de transcripción y la viabilidad celular es posible establecer una correlación hipotética entre la actividad transcripcional de los mismos y la muerte neuronal observada como consecuencia de la exposición al péptido amiloide, siempre que sea válida la suposición de que una menor transcripción génica conlleva una menor actividad, lo cual suele cumplirse para los factores de transcripción. Esta hipótesis se basa en que una menor cantidad de factores CREB y CREM hacen a la célula más vulnerable frente a la toxicidad por exposición a βA_{25-35} . Según esta hipótesis es posible explicar los resultados obtenidos en los experimentos de viabilidad con los niveles de transcripción de estos factores, así, a tiempos cortos de exposición se observa una disminución de la transcripción lo que produce un impacto negativo sobre la viabilidad celular, sin embargo, al prolongar la exposición al péptido amiloide se observa que el efecto nocivo no aumenta, sino que se mantiene, lo cual está acompañado por un aumento de la expresión de ambos factores. En el último tiempo de estudio se observa que los niveles de expresión de estos factores son similares al control, mientras que el efecto nocivo del péptido amiloide tampoco aumenta. Existen otros hechos experimentales que respaldan esta hipótesis, por ejemplo, se ha demostrado recientemente que en células C6

un aumento en la fosforilación de CREB supone una mayor producción de GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) (Hisaoka y col., 2008), una molécula implicada en el desarrollo, funcionalidad y regeneración del sistema nervioso (revisado por Paratcha y Ledda, 2008). Además, en otros sistemas la activación de CREB produce la proliferación de células progenitoras (Peltier y col., 2007). En cualquier caso, dado que la lista de genes controlados por el factor CREB supera los 100 (revisado por Mayr y Montminy, 2001) serán necesarios experimentos adicionales que den cuenta del mecanismo sobre el que se sustentaría esta hipótesis.

V.5. Daño celular producido por estrés oxidativo: efecto del peróxido de hidrógeno.

V.5.1 En cultivos primarios de neuronas de corteza.

En este capítulo se ha descrito el efecto que ejerce un potente agente oxidante sobre las neuronas corticales *in vitro*. Además de la disminución en la viabilidad celular, dependiente de la concentración y del tiempo de exposición, se ha comprobado el efecto del daño oxidativo en la modulación de los receptores de glutamato y los de adenosina, así como en las vías principales de transducción en las que estos receptores están implicados.

El uso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como modelo celular del daño oxidativo se propuso inicialmente en 1995 por Whittemore y colaboradores, los cuales proponían su empleo como agente causante de especies reactivas de oxígeno, las cuales emularían la liberación de radicales libres observadas en determinadas enfermedades neurodegenerativas (Whittemore y col., 1995). Además, se ha comprobado que el estrés oxidativo es una característica común en ciertas enfermedades neurodegenerativas (Coyle y Puttfarcken, 1993; Olanow, 1993). En el trabajo de Whittemore se describió que, en cultivos primarios de neuronas corticales, tras 2-3 DIV la exposición a H_2O_2 producía muerte neuronal apoptótica a concentraciones tan bajas como 10 μM . Poco después se propuso que existía una relación directa entre estrés oxidativo y apoptosis en neurodegeneración (Gorman y col., 1996). Los experimentos descritos eran reproducibles cuando se realizaban en cultivos primarios entre los días 5 y 6 de cultivo (Williams y col., 2004), describiéndose además la activación de la quinasa JNK (*c-jun-N-terminal kinase*), cuya activación está relacionada con apoptosis neuronal inducida por estrés oxidativo (Crossthwaite y col., 2002). Resultados similares se obtuvieron en experimentos realizados en cultivos de 7-8 DIV (Yu y col., 2008), donde se observó que la muerte celular era dependiente de la concentración de H_2O_2 empleada. Según los experimentos realizados por Nakamichi y colaboradores (Nakamichi y col., 2005), en neuronas corticales a 3 y a 9 DIV, la muerte celular producida por el H_2O_2 era apoptótica y dependía de la concentración pero no del tiempo de exposición. Esta diferencia con los resultados mostrados en la presente Memoria se debe a que los experimentos de Nakamichi se realizaron a tiempos superiores a las 6 horas de exposición, quedando fuera de su sistema de estudio los tiempos inferiores a las 2 horas, que son los aquí estudiados. Por tanto, a pesar de no observarse una activación génica de la caspasa 3

no se puede descartar que la muerte observada en estas células, en estas condiciones, sea de tipo apoptótica, como parecen confirmar las referencias bibliográficas aquí expuestas.

Ya se ha comentado con anterioridad el papel que desempeña la familia de factores de transcripción CREB y CREM en el mantenimiento de la supervivencia celular. Además, el factor CREB resulta activado al ser fosforilado por la quinasa Akt, cuya señalización también se considera neuroprotectora (Walton y Dragunow, 2000). Se ha propuesto que un factor importante en la patogénesis de enfermedades priónicas puede ser el estrés oxidativo (Freixes y col., 2006). Además, en pacientes de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob se han detectado niveles disminuidos tanto de CREB como de su forma activada (Rodríguez y Ferrer, 2007). Estos antecedentes, junto con la disminución observada en la transcripción de los factores CREB y CREM presentada aquí, permiten suponer que la funcionalidad de estos factores podría también estar alterada en este modelo de estrés oxidativo.

En los resultados expuestos en la presente *Memoria*, se ha constatado que la exposición de neuronas corticales a H_2O_2 produce un aumento en la cantidad de los receptores metabotrópicos de glutamato presentes en la superficie celular, la cual va acompañada de un aumento en la afinidad de los mismos por su ligando. Esto parece indicar una mayor “avidez celular” por la señal mediada por los receptores metabotrópicos de glutamato. Existen varios estudios que afirman que la neuroprotección mediada por estos receptores se produce principalmente en aquellas situaciones en las que el agente tóxico produce muerte celular apoptótica. En ellos se propone que esta neuroprotección se basa en la activación, por diferentes vías, de la PI3K y la ruta de señalización de las MAP quinasas, produciéndose, en definitiva, una disminución en la concentración de las especies reactivas de oxígeno y, con ello, una disminución del estrés oxidativo celular y de la muerte celular programada (Spillson y Russell, 2003). Por otro lado, también se ha descrito en la presente *Memoria* que el aumento en la cantidad de receptores metabotrópicos es debido, al menos en parte, al aumento del número de receptores $mGlu_1$ y $mGlu_{2,3}$, pero no al subtipo $mGlu_5$, demostrando, una vez más, la gran variedad de eventos reguladores que modulan la expresión de los distintos subtipos de receptores metabotrópicos de manera específica, ya que, receptores con funciones similares, como es el caso de los receptores $mGlu_1$ y $mGlu_5$, resultan modulados de forma diferente ante un mismo estímulo.

Este fenómeno de regulación diferencial de los receptores $mGlu_1$ y $mGlu_5$ fue observado en un modelo de estrés oxidativo inducido por la eliminación de cistina del medio en cultivos primarios de neuronas corticales (Sagara y Schubert, 1998), en el cual se observaba que las condiciones de estrés oxidativo ensayadas aumentaban la expresión del receptor $mGlu_1$ en membrana plasmática sin variar la de $mGlu_5$. Estos autores proponen que el mecanismo de protección controlado por los receptores del grupo I puede estar relacionado con aumentos en los niveles de IP_3 y de Ca^{2+} intracelulares. De acuerdo con estos resultados, se ha observado que, en cultivos primarios de corteza de rata, el empleo de (S)-DHPG, agonista del grupo I de los receptores metabotrópicos de glutamato, puede mitigar el daño celular ocasionado como consecuencia de la exposición a H_2O_2 (Zhu y col., 2004). Por otro lado, en otros tejidos como hipocampo de ratón, se ha demostrado que el empleo de agonistas del grupo I y II mejoran, aunque sólo parcialmente, el daño producido por la exposición a H_2O_2 (Saransaari y Oja, 2004). Estos autores han propuesto recientemente que el neurotransmisor GABA tiene

un papel neuroprotector en situaciones de estrés oxidativo así, en hipocampo de ratón en presencia de H_2O_2 , el empleo de agonistas del grupo I y II aumentaba la liberación de GABA, mientras que los agonistas del grupo III la disminuía, resultando por tanto los primeros beneficiosos y los segundos perjudiciales para la viabilidad de las células del hipocampo (Saransaari y Oja, 2008). Sin embargo, el papel de los receptores del grupo II parece depender del tipo celular así como de la especie estudiada, ya que, según un estudio realizado por Moldrich y colaboradores, los agonistas del grupo II no eran capaces de mitigar el daño producido por varios agentes tóxicos, entre ellos H_2O_2 , en células de corteza, de estriado y granulares de ratón (Moldrich y col., 2001).

El aumento de los subtipos $mGlu_1$ y $mGlu_{2,3}$, cuyo potencial neuroprotector ya ha sido comentado, se traduce además en una potenciación de sus vías de señalización principales, las enzimas PLC y AC, respectivamente, lo que sugiere que el efecto neuroprotector de ambos receptores podría estar relacionado con sus efectos sobre los niveles de IP_3 y AMPc. Las propiedades neuroprotectores de la activación de la enzima $PLC\beta_1$ ya se han comentado con anterioridad en la presente Memoria (Lee y col., 2000b; Nagasaca y col., 2004; Yasuda y col., 2008). El mecanismo de protección que implica la activación de los receptores metabotrópicos del grupo I en modelos de estrés oxidativo parece estar relacionado con la capacidad de estos receptores de aumentar los niveles del antioxidante glutatión (GSH) (Sagara y Schubert, 1998). Este aumento de GSH podría ser suficiente para inhibir todos los eventos posteriores que conducirían a la muerte celular (Tan y col., 1998). Sin embargo, aunque el mecanismo está aún por definir, Sagara y Schubert propusieron que la activación de los $mGlu$ del grupo I podría afectar a la expresión o actividad de proteínas requeridas para mantener la homeostasia celular en condiciones de estrés. El mismo papel antioxidante ha sido adjudicado a los receptores metabotrópicos del grupo II (para revisión ver: Anjaneyulu y col., 2008). Dado el elevado número de procesos de señalización con los que están relacionados los receptores metabotrópicos de glutamato como, por ejemplo, procesos de fosforilación/desfosforilación, interacciones proteína-proteína o trans-activación de genes (para revisión ver Conn y Pin, 1997; Michaelis, 1998), serían necesarios experimentos adicionales que confirmaran cuál de estas diversas funciones es la encargada de la neuroprotección en situaciones de estrés oxidativo.

Según los resultados presentados, en células corticales *in vitro* se ha observado que el estrés oxidativo produce un aumento de los receptores A_1 en membrana y una disminución de los A_{2A} , sin observarse, en ninguno de los dos casos, variaciones en la expresión de los correspondientes genes. Por otro lado, el incremento del receptor A_1 viene acompañado de una potenciación en su vía de transducción principal, mientras que el descenso de A_{2A} también supone una disminución en la funcionalidad de este receptor.

La adenosina, actuando a través de sus receptores, es capaz de modular el daño en los tejidos así como participar en la reparación de los mismos (para revisión ver Fredholm, 2007). Se ha comentado con anterioridad el efecto neuroprotector que ejercen los agonistas del receptor A_1 , así como los antagonistas del receptor A_{2A} , en otros modelos de toxicidad celular. Ya en 1995 se determinó que la adenosina liberada durante la hipoxia bloqueaba los efectos mecánicos y metabólicos que inducía la exposición a H_2O_2 en corazón de rata y lo hacía, al menos en parte, a través de los receptores A_1 (Hara y Abiko, 1995). Además, la activación de los receptores A_1 ha resultado citoprotectora en otros modelos de estrés oxidativo, como el inducido

mediante el empleo de cisplatino, un agente quimioterapéutico que produce neurotoxicidad como efecto secundario. La administración de cisplatino producía en cóclea un aumento de los receptores A_1 , el cual, según Ford y colaboradores, podría representar un mecanismo de compensación destinado a contrarrestar los efectos tóxicos del cisplatino (Ford y col., 1997). Con posterioridad, se demostró que esta hipótesis era acertada puesto que el empleo de agonistas del receptor A_1 en la cóclea protegía del daño ocasionado por el cisplatino (Whitworth y col., 2004). Además, en este mismo trabajo, el empleo de agonistas del receptor A_{2A} incrementaba los efectos del cisplatino. La propia adenosina ha demostrado su potencial neuroprotector en lesiones inducidas como consecuencia de un aumento de la cantidad de radicales libres en cortes de hipocampo (Almeida y col., 2003). Más recientemente, ha sido demostrado que, en células granulares, el empleo de agonistas del receptor A_1 y de antagonistas del receptor A_{2A} disminuía el daño oxidativo desencadenado por H_2O_2 (Fatokum y col., 2007). Por otro lado, el empleo de ligandos del receptor A_{2A} resulta más prometedor a la hora de desarrollar terapias neuroprotectoras ya que, la eficacia de la activación de los receptores A_1 podría resultar disminuida debido a una activación concomitante de los receptores NMDA (Stone, 2005). Se ha demostrado que los metabolitos de la cafeína producen la inhibición de la enzima PARP-1 (poli(ADP-ribosa) polimerasa 1) (Geraets y col., 2006), cuya activación se relaciona con la fisiopatología de varias enfermedades. Dado que, en condiciones fisiológicas, la acción principal de la cafeína es el bloqueo de los receptores A_{2A} (Fredholm y col., 2007), es razonable suponer que una de las vías por las que los antagonistas de los receptores A_{2A} resultan neuroprotectores es la inhibición de PARP-1 en condiciones patológicas. No obstante, no deben descartarse otras posibles vías de neuroprotección reguladas por efectos antioxidantes de estos receptores (Fatokum y col., 2007).

Por otro lado, la activación de los receptores A_{2A} ha resultado ser protectora en otros estudios por varios mecanismos (Arslan y Fredholm, 2000; Lee y Chao, 2001; Cunha-Reis y col., 2008), lo que sugiere que, aunque en general su bloqueo resulte neuroprotector, no hay una norma general que regule la acción protectora de estos receptores.

V.5.2 En células C6 de glioma de rata.

La exposición a H_2O_2 empleada a 500 μM durante 30 minutos producía muerte celular. A 30 minutos de exposición se detectó un incremento de la expresión del gen codificante para la caspasa 3. Estas células han sido empleadas con anterioridad por otros grupos de investigación en los últimos años como modelo para el estudio del daño oxidativo producido por la exposición a H_2O_2 . Así, se determinó que la muerte celular observada era apoptótica debido a la activación de la caspasa 3, produciéndose, además, la activación del factor $NF\kappa B$, de la quinasa JNK y de la proteína p38 (Marangolo y col., 2001). Posteriormente, se observó que durante la exposición de las C6 a H_2O_2 también se producían aumentos en la concentración de Ca^{2+} intracelular, del ratio Bax/BCL-2 y de la actividad de la proteasa calpaína (Sur y col., 2003). Más recientemente se ha demostrado que estos procesos disminuyen los niveles de GRK2 debido a la acción de la calpaína y de la ciclina cdk1 (Cobelens y col., 2007).

De forma similar a lo descrito en el caso de neuronas corticales, la exposición de las células C6 a H_2O_2 produce una regulación diferencial de la expresión de los receptores metabotrópicos de glutamato. En este caso, la regulación observada resulta más llamativa debido al hecho de que los principales subtipos que se modulan como consecuencia del estrés oxidativo se encuentran englobados dentro del mismo grupo de receptores metabotrópicos, siendo por tanto sus funciones similares, y, sin embargo, su modulación se produce en sentidos diferentes, resultando aumentada la expresión de $mGlu_1$ y disminuida la de $mGlu_5$. Esta regulación selectiva de los receptores ya se ha observado con anterioridad en otros trabajos, además de los comentados en el apartado anterior, y sin embargo esta es, hasta la fecha, la primera descripción de un comportamiento aparentemente antagónico de dos receptores metabotrópicos del mismo grupo estudiados en el mismo sistema. Este hecho representa un nuevo ejemplo de la versatilidad de los receptores metabotrópicos de glutamato para desencadenar procesos de neuroprotección mediante la regulación de su expresión de forma diferente, en función del estímulo tóxico, así como del tipo celular del estudio. Por otro lado, una familia de proteínas implicada en la función y expresión de los receptores metabotrópicos de glutamato, las GRK, en concreto las del subtipo 2, resultan disminuidas en células C6 como consecuencia de la activación de calpaína tras la exposición a H_2O_2 (Cobelens y col., 2007). Las GRK2 presentan capacidad de regular la expresión y función de los receptores $mGlu_1$ sin necesidad de fosforilarlos (Dhami y Ferguson, 2006) así como de regular el subtipo $mGlu_5$ gracias a su actividad quinasa (Sorensen y Conn, 2003). La disminución en el subtipo GRK2, así como modulaciones en otros subtipos de GRKs o variaciones en la actividad quinasa de las mismas no estudiadas hasta la fecha, podrían explicar las diferencias observadas en la expresión de los subtipos de receptores del grupo I en este modelo.

Fenómenos de regulación similares se han observado en otros sistemas. Así, en células HT22, una línea inmortalizada de hipocampo, las condiciones de estrés oxidativo producen un aumento de la expresión del receptor $mGlu_5$ pero no del $mGlu_1$ ni de $mGlu_{2,3}$ (Sagara y Schubert, 1998). Por otro lado, en cultivos primarios de oligodendrocitos de cerebro de rata se observó que la activación de los receptores del grupo I disminuía el efecto tóxico de las condiciones de estrés a través de mecanismos antioxidantes (Deng y col., 2004). En estos experimentos se demostró que los receptores del grupo I mantenían los niveles de glutatión constantes en estas condiciones y para ello era necesaria la activación de la $PKC\alpha$. Otros autores proponen que cuando en enfermedades neurodegenerativas se observan regulaciones al alza de los receptores metabotrópicos en células gliales, estas regulaciones conllevan, generalmente, un aumento en la capacidad de estas células de liberar al medio factores tróficos (Aronica y col., 2000), los cuales serían responsables del efecto neuroprotector observado al activar estos receptores (para revisión ver Spillson y Russell, 2003). Por otro lado, también se ha demostrado que el antagonismo de estos receptores, principalmente del subtipo $mGlu_5$, resulta neuroprotector en modelos *in vivo* frente a la administración de 6-hidroxidopamina (Vernon y col., 2007). En resumen, se podría citar un trabajo de Bruno y colaboradores que propone que esta variabilidad en la respuesta de los receptores metabotrópicos frente a agonistas y antagonistas sea debida a que la función de estos receptores depende de su actividad previa, de tal forma que en función de la “historia” previa del receptor su activación puede derivar hacia la neuroprotección o hacia la neurotoxicidad (Bruno y col., 2001). De

acuerdo con esta hipótesis un reciente trabajo afirma que los receptores mGlu₁ pueden ser neuroprotectores o neurotóxicos en función de las condiciones tróficas del medio (Pshenichkin y col., 2008).

A pesar de que históricamente los aumentos en los niveles de calcio intracelulares se hayan relacionado con procesos neurotóxicos durante la excitotoxicidad, sin embargo es bien conocida la función esencial del calcio en la fisiología celular. En este sentido, niveles elevados de calcio pueden activar determinadas quinasas, como calmodulina quinasa, PKC, PKA o las MAP quinasas, y fosfatasa (para revisión ver Finkbeiner y Greenberg., 1998), claves para la función celular e implicadas además en procesos de neuroprotección. De hecho, se conoce que la acción neuroprotectora de los estrógenos se debe al incremento de los niveles de calcio intracelular (Sarkar y col., 2008). Como ya se ha apuntado anteriormente, se ha observado que la neuroprotección en el modelo de C6 depende de la activación de PKC α , proteína incluida en la subfamilia PKC clásica o convencional que requiere de la presencia de calcio, entre otros factores, para su activación (para revisión ver Martiny-Baron y Fabbro, 2007). Otros trabajos también apoyan la hipótesis de que en estas condiciones el aumento de calcio puede resultar neuroprotector o, al menos, no es la causa de la muerte celular observada en células C6. Así, al transfectar varias conexinas en células C6, entre cuyas funciones se incluye la de estabilizar la homeostasia del calcio disminuyendo así la vulnerabilidad celular al estrés oxidativo (Blanc y col., 1998; Andrade-Rozental y col., 2000), se dedujo que no era necesaria la capacidad de las mismas de formar *gap junctions* para reducir la toxicidad del H₂O₂ (Lin y col., 2003), sino que el efecto protector era debido a mecanismos de señalización intracelular (Giardina y col., 2007), es decir, no era necesario disminuir los aumentos observados en los niveles de calcio para observar una mejora en la viabilidad celular.

Las características neuroprotectoras de la activación de los receptores A₁ así como del bloqueo de los receptores A_{2A} han sido discutidas ampliamente en la presente *Memoria*. Sin embargo, en células C6 expuestas a la acción tóxica del peróxido de hidrógeno se ha observado que el estrés oxidativo produce un incremento de la expresión de los receptores A₁ y A_{2A}, cuyas acciones transcurren, en principio, de manera antagónica. Por otro lado se ha realizado el estudio de los niveles de la enzima AC I. Esta enzima se eligió debido a su relación con los receptores de adenosina, por ser la isoforma de la AC específica de tejido neuronal (Xia y col., 1993) y por haber estado implicada en varios modelos de aprendizaje y adaptación celular (revisado por Mons y Cooper, 1995). El posible carácter neuroprotector de la activación de los receptores A_{2A} ya se adelantó en el apartado anterior. En relación con el efecto tóxico del H₂O₂, se observó que la activación de los receptores A₁ y A_{2A} en osteoblastos inmortalizados contrarrestaba dicho efecto (Fatokum y col., 2006). La activación del receptor A_{2A} ya había mostrado previamente un efecto mitogénico en células endoteliales venosas de cordón umbilical, a través de la activación de las MAP quinasas (Sextl y col., 1997). En células HK-2 de túbulo proximal humano se propuso que la protección frente a H₂O₂ por la activación de los receptores A₁ se producía por activación de la PKC a través de una proteína G_{i/o} mientras que la protección observada por la activación de los receptores A_{2A} se producía por la ruta de señalización dependiente de AMPc y activación de la PKA (Lee y Emala, 2002). Además, estos autores demuestran que la activación de A_{2A} produce una recuperación de la función de CREB y proponen que esta recuperación se traduce en una mejora en la viabilidad celular. Por último, en células más cercanas al SNC, como son las PC12, se demostró de nuevo que la activación de los

receptores A_{2A} protegía del daño originado por la privación de suero, lo que, a su vez, aumentaba las ROS en PC12 (Satoh y col., 1996), mediante la activación de PKA (Huang, 2003). En este caso se propone que la activación de los receptores A_{2A} en células PC12 tiene un efecto antioxidante, al igual que ocurre en neutrófilos (Walker y col., 1997), de tal forma que las vías de transducción que se activan a través de la PKA confluyen en intentar mantener las cantidades de agentes antioxidantes como el glutathione. Los precedentes bibliográficos citados en la presente Discusión, unidos a los hechos experimentales expuestos, representan un ejemplo de la versatilidad de las funciones de los distintos receptores de adenosina en distintos tipos celulares destinadas a preservar la integridad de un determinado tejido.

Por último, dada la relación de los factores CREB y CREM con la viabilidad celular comentada en apartados anteriores, es posible que, en estas células, el que no varíen los niveles de transcripción de CREB y CREM, e incluso tengan una tendencia no significativa a aumentar su expresión, influya en la viabilidad celular, frente a lo observado en cultivos de neuronas.

V.6. Modulación de los receptores de adenosina en un modelo de envejecimiento acelerado.

Este estudio es el primero en examinar la expresión de los ARNm de los diferentes receptores de adenosina y en cuantificar de los receptores A_1 y A_{2A} en cerebro de ratones SAMR1 y SAMP8. Los resultados expuestos en la presente *Memoria* demuestran que en los ratones SAMR1 ocurre una pérdida de receptores A_1 relacionada con la edad, asociada a un incremento en la expresión génica del mismo, lo que podría considerarse un mecanismo compensatorio para evitar la pérdida de receptor a nivel de membrana plasmática, mientras que en ratones SAMP8 jóvenes ya se observan niveles de receptor similares a los detectados en los ratones SAMR1 de más edad y, además, estos niveles no variaban con la edad. Por el contrario, en el caso del receptor A_{2A} los cambios relacionados con la edad suponen un incremento en la cantidad de receptores A_{2A} en los ratones SAMR1, mientras que no se observó variación en los ratones SAMP8, donde los niveles detectados eran similares a los observados en ratones SAMR1 jóvenes. Sin embargo, el resultado más novedoso de este estudio es que los receptores A_1 de adenosina, cuya activación se considera neuroprotectora, se encuentran muy disminuidos en ratones SAMP8 lo que sugiere una gran afectación de estos receptores en este modelo experimental. El análisis de los cambios relacionados con la edad en el receptor A_1 se completó mediante el estudio de estos receptores en cerebros de ratas Wistar de 3 y 24 meses, donde se corroboraron los resultados obtenidos en ratones SAM.

En función de la especie, la cepa y la edad estudiada han sido descritos cambios morfológicos en el cerebro durante el proceso de envejecimiento. Los cambios en los receptores A_1 y A_{2A} de adenosina y en su función también han sido demostrados previamente, observándose una disminución del receptor A_1 y un aumento del receptor A_{2A} (Rodrigues y col., 2008; para revisión ver Cunha, 2005). Los cambios observados con la edad en los receptores A_1 en cerebros de ratones SAMR1, de envejecimiento fisiológico, son consistentes con los datos publicados previamente. Así, en cerebro de ratón se describieron variaciones en el ensayo de unión

de CHA, observándose en corteza, hipocampo y cerebelo de ratones de 28 meses de edad disminuciones de un 44, 50 y 12%, respectivamente, con respecto a los datos obtenidos en las mismas áreas de ratones de 3 meses de edad (Pagonopoulou y Argelatou, 1992). Más recientemente, ha sido confirmado, también en ratón, la pérdida de receptores A_1 en varias estructuras corticales y subcorticales implicadas en el papel neuromodulador de la adenosina. Dado que ésta disminuye la actividad eléctrica la pérdida de receptores A_1 estaría relacionada con el aumento de la excitabilidad neuronal durante el envejecimiento (Ekonomou y col., 2000). Por otro lado, existen varios precedentes que confirman que con la edad se producen variaciones de los niveles de receptor A_{2A} en varios sistemas, como se ha mencionado previamente. Por ejemplo, en corteza de cerebro de rata se determinó un aumento del doble en el número de receptores A_{2A} en ratas de 24 meses de edad con respecto a las de 6 semanas, sin embargo, se observaba una tendencia decreciente en estriado (Cunha y col., 1995). Esta tendencia a la disminución de receptores A_{2A} se confirmó posteriormente en el estriado de ratas adultas (Fredholm y col., 1998). Sin embargo, en esta misma localización no se encontraron diferencias en la capacidad de los receptores A_{2A} de estimular la liberación de glutamato entre ratas jóvenes y adultas (Cosi y col., 1999). Estas diferencias entre estriado y corteza, en lo que a expresión y funcionalidad de los receptores A_{2A} se refiere, fueron estudiadas detalladamente por Lopes y colaboradores corroborando los resultados anteriores (Lopes y col., 1999a). Estos estudios sugieren que, con la edad y, por lo menos, en la corteza cerebral, el balance entre la acción inhibitoria de los receptores A_1 y la acción estimuladora de los receptores A_{2A} se desplaza hasta estos últimos.

Los resultados expuestos en ratas Wistar se correlacionan bien con los publicados previamente por Cunha y colaboradores, según los cuales la densidad de receptores A_1 en ratas de 24 meses disminuía un 33% en hipocampo y un 60% en corteza cuando se comparaba con ratas de 6 semanas, sin cambios aparentes en la K_D (Cunha y col., 1995). Por otro lado, también se observó una disminución en la unión de DPCPX tritiado a membranas hipocámpales en ratas viejas con respecto a las jóvenes (Sperlágh y col., 1997). Un estudio de la disminución de los receptores A_1 con el tiempo de envejecimiento fue llevado a cabo por Cheng y colaboradores en corteza de ratas Wistar (Cheng y col., 2000). En este trabajo se demostró, mediante *Western blot*, que en comparación con animales de 2 meses de edad, los animales de 6 meses ya presentaban menos cantidad de receptores A_1 , la cual seguía disminuyendo con la edad. Por último, el patrón de unión de DPCPX disminuía con la edad en membranas de cerebro completo de ratas Wistar macho, sin observarse cambios en los valores de afinidad entre los grupos de edad estudiados (Cunha y col., 2001b).

La pérdida de receptores A_1 a nivel de la membrana plasmática ha sido frecuentemente asociada a una regulación a la baja del receptor A_1 como consecuencia de una sobreexposición a su ligando. En modelos *in vivo* este grupo de investigación ha sugerido que la pérdida y desensibilización de los receptores A_1 es producida por elevados niveles de adenosina (León y col., 2002; 2004 y 2005). A esta hipótesis se añade el hecho de que, en condiciones nocivas e incluso con la edad, el papel modulador de la adenosina en el cerebro está alterado debido a los elevados niveles de adenosina, los cuales, a su vez, modulan la densidad de sus receptores (Lopes y col., 1999b; revisado por Cunha, 2005). Estudios previos han demostrado que los niveles extracelulares de adenosina endógena en preparaciones hipocámpales de ratas viejas son más elevados que los detectados en

las preparaciones de ratas jóvenes (Sperlágh y col., 1997; Cunha y col., 2001a). Además, los niveles extracelulares de adenosina en cerebro basal son más elevados en animales viejos que en jóvenes (Murillo-Rodríguez y col., 2004), lo que podría deberse a un incremento en la actividad de 5'-nucleotidasas con la edad (Cunha y col., 2001a; Mackiewicz y col., 2006). También en el hipocampo aumenta el nivel de adenosina en el líquido extracelular, asociado con una regulación a la baja y una disminución de la respuesta de los receptores A₁ presinápticos (Sperlágh y col., 1997). Por otro lado, se ha propuesto que estos niveles elevados de adenosina podrían producir una activación tónica de los receptores A₁ que aminorara la pérdida de funcionalidad de estos receptores detectada con la edad (Sebastião y col., 2000). Debido a todos estos antecedentes, es razonable postular que elevados niveles de adenosina pueden ser responsables de la pérdida con la edad de receptores A₁ en ratones SAMR1.

Al contrario de los resultados obtenidos a nivel de ARNm en la presente *Memoria*, se describió previamente una disminución en los niveles de ARNm del receptor A₁ en corteza de ratas macho viejas con respecto a las jóvenes, empleando la técnica de *Northern blot* (Cheng y col., 2000). Este trabajo contrasta con los resultados mostrados empleando la técnica de PCR a tiempo real con homogenados de cerebro, donde se detectaba un incremento de la cantidad del ARNm codificante para el receptor A₁ con la edad en los ratones SAMR1, lo que podría entenderse como un mecanismo de compensación frente a la pérdida de receptor A₁ a nivel de la membrana plasmática posiblemente inducida por elevados niveles de adenosina. En cualquier caso, estos mecanismos no se detectan en los ratones SAMP8, donde un nivel más bajo de receptor A₁ no se relaciona con un incremento en su transcripción, probablemente como consecuencia de algún mecanismo defectuoso en estos ratones al no observarse regulación de estos receptores por el envejecimiento, como sí ocurre con los SAMR1.

Los ratones SAMP8 han sido empleados como modelo animal de la enfermedad de Alzheimer debido a que producen un exceso de proteína APP en el hipocampo y, en las últimas etapas de su vida, desarrollan placas amiloides (Morley y col., 2000). Por último, se ha descrito que los niveles de APP y péptido amiloide en ratones SAMP8 de 12 meses de edad eran más elevados, en torno al doble, que los encontrados en ratones SAMP8 de 4 meses de edad, los cuales se traducían en severos déficits de aprendizaje y memoria. Estos problemas de aprendizaje y memoria podían revertirse mediante terapia con anticuerpos o oligonucleótidos antisentido contra β -amiloide (Kumar y col., 2000; Morley y col., 2000). Por este motivo, la cepa SAMP8 representa un modelo de deterioro cognitivo dependiente de la deposición del péptido amiloide con el envejecimiento (para revisión ver Pallàs y col., 2008).

La pérdida de receptores A₁ descrita en estos animales podría estar relacionada con los niveles anormalmente elevados de péptido amiloide descritos en este modelo de envejecimiento, los cuales, por otro lado, son característicos de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, por un lado, no existen referencias bibliográficas que aporten datos acerca de los niveles de péptido amiloide en animales de tan solo 3 semanas de edad, en los cuales ya se apreciaba una pérdida significativa de receptores A₁ con respecto a los SAMR1 de la misma edad y, por otro lado, esta hipótesis contrasta con los resultados obtenidos por este grupo de investigación en necropsias de cerebros de pacientes de Alzheimer, en los que se observaba un aumento de

receptores A₁ ya en las primeras etapas de la enfermedad que se mantenía con el progreso de la misma (Albasanz y col., 2008). Además, la regulación al alza de los receptores A₁ ha sido descrita en cerebros de pacientes de otras demencias como la enfermedad de Pick o la demencia con granos argirófilos, en las cuales no hay acumulación de péptido amiloide (Albasanz y col., 2007; Perez-Buira y col., 2007). Por estos motivos la variación en los receptores de adenosina no parece estar relacionada con la acumulación del péptido amiloide, sino que, como se postuló anteriormente, parece más probablemente relacionada con un incremento en los niveles de adenosina endógena. De acuerdo con esta hipótesis se encuentra el hecho de que en pacientes de Alzheimer se han encontrado niveles de adenosina endógena menores que podrían explicar el incremento detectado en la cantidad de receptores A₁ en cerebros de estos pacientes (Selley, 2004). Además, la propia adenosina, y agentes farmacológicos que aumenten sus niveles extracelulares han sido propuestos como posibles refuerzos en el tratamiento con inhibidores de la colinesterasa en la enfermedad de Alzheimer (Ferroni y col., 2002; Schubert y col., 2001).

A pesar de que no existan datos en la bibliografía acerca de la cantidad de adenosina extracelular en estos animales, sí se han descrito variaciones en otros sistemas de neurotransmisores en ratones SAM. Así se han descrito disminuciones en los niveles de serotonina y acetilcolina e incrementos en los de GABA en ratones SAMP8 (Morley, 2002). Por otro lado, en hipocampo y en corteza cerebral de los ratones SAMP8 el contenido de glutamato y glutamina encontrado fue más elevado que en ratones SAMR1 entre 2 y 14 meses, mientras que el contenido de aspartato y alanina fue más bajo (Nomura y Okuma., 1999; Kitamura y col., 1992). De acuerdo con esto, el valor de unión máxima de la unión de [³H]dizocilpina, un inhibidor de los receptores NMDA, en membranas corticales se encontraba disminuido con la edad en los ratones SAMP8 pero no en los SAMR1 (Kitamura y col., 1992). Además, la unión de [³H]MK-801 en hipocampo a los receptores NMDA también se encontraba disminuida en ratones SAMP8 con respecto a los SAMR1, lo que indicaba que las funciones de los receptores NMDA podrían ser deficientes en este modelo de envejecimiento acelerado, lo que podría, a su vez, estar relacionado con el envejecimiento acelerado y los déficits de aprendizaje y memoria de estos animales (Kitamura y col., 1992; Nomura y col., 1997). Esta disminución en los receptores NMDA en los ratones SAMP8 con la edad, que ya había sido previamente descrita (Zhao y Nomura, 1990), es importante debido a la implicación de la acumulación local de aminoácidos excitadores en fenómenos excitotóxicos (revisado por Olney, 1990). Niveles de glutamato elevados han sido encontrados en varias áreas cerebrales en la enfermedad de Alzheimer (Procter y col., 1988), producido, al menos en parte, como resultado del fallo en la eliminación del glutamato de la sinapsis neuronal (Greenamyre y Young, 1989). De acuerdo con estos datos se encuentra un trabajo de este grupo de investigación en el que se describió la disminución de los receptores metabotrópicos de glutamato en la corteza cerebral de pacientes de la enfermedad de Lewy en su forma común y de Alzheimer (Albasanz y col., 2005). Por otro lado, la adenosina actúa como una sustancia neuroprotectora principalmente a través de los receptores A₁. La activación de los receptores A₁ inhibe la liberación de glutamato reduciendo así la excitabilidad neuronal, por este motivo, la pérdida de receptores A₁ podría ser la causa de los elevados niveles de glutamato en este modelo de envejecimiento.

En resumen, en los ratones SAMR1 se observaron los mismos cambios relacionados con la edad en el estudio de los receptores A_1 que los observados en ratas, aunque, en los ratones, el descenso descrito se producía a edades más tempranas. Además, en cerebros de ratones SAMP8 jóvenes ya se encontraba una pérdida significativa de los receptores A_1 , los cuales se encontraban a niveles incluso menores que los detectados en ratones SAMR1 de más edad. Existen estudios *in vivo* en humanos, realizados mediante tomografía de emisión de positrones (PET), en los que se detecta una pérdida de receptores A_1 dependiente de la edad, que podría resultar importante en varias enfermedades neurológicas relacionadas con la edad ([Meyer y col., 2006](#)). Por este motivo, los ratones SAM representan un importante modelo para estudiar la alteración de receptores de neurotransmisores relacionados con enfermedades neurodegenerativas.

CONCLUSIONES

1. Los cuatro receptores de adenosina descritos hasta la fecha se expresan en células C6 de glioma de rata. Se ha demostrado para dos de ellos, los receptores A_1 y A_{2A} , que están funcionalmente acoplados de manera inhibidora y estimuladora, respectivamente, a la enzima adenilato ciclasa. Los receptores A_1 lo hacen a través de una proteína G_i sensible a PTX y los A_{2A} a través de una proteína G_s .
2. La exposición a glutamato resulta tóxica en neuronas corticales *in vitro*, observándose una regulación al alza de los receptores $mGlu_1$ y $mGlu_5$, que podría estar relacionada con una función neuroprotectora de estos receptores, aunque no se encuentra relacionada con la capacidad de los mismos de modular los niveles de calcio intracelulares. Los receptores A_1 y A_{2A} también se regulan al alza en las condiciones ensayadas, potenciándose sus vías de señalización, pudiendo estar relacionados con fenómenos de neuroprotección los primeros y de neurodegeneración los segundos.
3. Las células C6 son resistentes a la exposición a elevadas concentraciones de glutamato durante periodos prolongados de tiempo. Durante el proceso de exposición a glutamato se observa un aumento en el número de receptores metabotrópicos totales, una disminución de los receptores $mGlu_1$ y, probablemente, un aumento de los receptores metabotrópicos del grupo III, pudiendo estar ambos efectos relacionados con la elevada resistencia de estas células frente a la excitotoxicidad. En estas condiciones, se observa una regulación opuesta de los receptores de adenosina, al alza los A_1 y a la baja los A_{2A} , así como de sus vías de señalización, lo que se podría corresponder con las funciones antagónicas de estos receptores.
4. La hipoxia moderada produce muerte celular apoptótica en neuronas corticales. Como consecuencia de la disminución de oxígeno los receptores metabotrópicos $mGlu_1$, $mGlu_5$ y $mGlu_{2,3}$ y los receptores A_1 aumentan su expresión en membrana plasmática, debido probablemente a su papel neuroprotector ante este estímulo. Por otro lado, los receptores A_{2A} disminuyen su presencia durante estos procesos debido probable a que su activación pueda desempeñar un papel nocivo.
5. En células C6, la hipoxia moderada no ejerce efectos tóxicos. Esta ausencia de toxicidad puede ser debida a los procesos de regulación observados. Por un lado, el aumento de los receptores $mGlu$ y del receptor A_1 de adenosina, por otro, la disminución del receptor A_{2A} . Se ha demostrado que la activación tónica del receptor A_1 orquesta los cambios observados en el receptor A_{2A} .
6. La adenosina mimetiza el efecto de la hipoxia moderada sobre la regulación de los receptores estudiados.
7. La exposición de neuronas corticales al péptido amiloide resulta tóxica, desencadenando procesos de apoptosis. En este modelo se detectan niveles de receptores $mGlu$ del grupo I aumentados y los del grupo II disminuidos. Al ser estas modulaciones contrarias a las observadas en cerebros humanos es posible que sean causa o consecuencia de mecanismos de defensa frente a la toxicidad mostrada por el péptido amiloide. Los receptores A_1 y A_{2A} aumentan en estas condiciones, aunque lo hacen en función del tiempo de exposición, lo que sugiere una distinta funcionalidad de estos receptores en este modelo experimental.
8. En células C6 el péptido amiloide produce muerte celular apoptótica, observándose un aumento de los receptores $mGlu$, aunque se observa una disminución de los receptores $mGlu_1$ que podrían ser

producidos por desregulaciones en la homeostasia del glutamato. Los receptores A_1 y A_{2A} aumentan en este modelo potenciándose sus vías de señalización.

9. El agua oxigenada produce muerte celular en neuronas regulando los receptores estudiados. Los receptores $mGlu_1$ y $mGlu_{2,3}$ aumentan en este modelo, potenciándose sus vías de señalización, mientras que los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} se regulan en sentidos opuestos, siendo los primeros aumentados y los segundos disminuidos, observándose el mismo efecto en la funcionalidad de ambos sistemas.
10. En células C6 la exposición a agua oxigenada resulta tóxica, detectándose aumentos en las cantidades de $mGlu_1$, A_1 , A_{2A} y $PLC\beta_1$ y disminuciones en la de $mGlu_5$.
11. El receptor A_1 y su funcionalidad disminuyen con la edad en cerebro de rata Wistar. Los ratones SAMR1 se comportan como las ratas Wistar, observándose una pérdida de A_1 con la edad. Sin embargo, los SAMP8 presentan receptores A_1 disminuidos a edad muy temprana, equiparándose a los SAMR1 viejos, sin observarse la progresión con la edad mencionada. Por otro lado, los ratones SAMP8 tampoco presentan la regulación de los receptores A_{2A} esperada con la edad, con valores similares a los de los SAMR1 jóvenes, los cuales aumentan en los SAMR1 viejos.

En esta *Memoria* se ha pretendido estudiar la implicación de los receptores metabotrópicos de glutamato y de adenosina en los mecanismos de muerte celular relacionada con enfermedades neurodegenerativas tomando como modelos celulares uno neuronal y otro de glía. Dicha implicación ha sido demostrada puesto que tales receptores se modulan por estímulos tóxicos. Aunque el sentido de la modulación parece depender del tipo de estímulo tóxico y del tipo celular estudiado, en general se observa un incremento de los receptores A_1 de adenosina y de algunos subtipos de receptores $mGlu$ en los modelos empleados, lo que justificaría su papel neuroprotector. Por su parte, la alteración del receptor A_{2A} parece contribuir al efecto excitotóxico o neurotóxico de los modelos ensayados. En cualquier caso, las modulaciones observadas podrían contribuir al diseño de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas que tengan a dichos receptores como dianas.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abbracchio M. P., Fogliatto G., Paoletti A. M., Rovati G. E. y Cattabeni F. (1992) Prolonged in vitro exposure of rat brain slices to adenosine analogues: selective desensitization of adenosine A1 but not A2 receptors. *Eur J Pharmacol* **227**, 317-324.
- Abrous D. N., Koehl M. y Le Moal M. (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* **85**, 523-569.
- Aebbersold D. M., Burri P., Beer K. T., Laissue J., Djonov V., Greiner R. H. y Semenza G. L. (2001) Expression of hypoxia-inducible factor-1 α : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* **61**, 2911-2916.
- Aguirre J. A., Andbjør B., González-Barón S., Hansson A., Strömberg L., Agnati L. F. y Fuxe K. (2001) Group I mGluR antagonist AIDA protects nigral DA cells from MPTP-induced injury. *Neuroreport* **12**, 2615-2617.
- Aiba A., Chen C., Herrup K., Rosenmund C., Stevens C. F. y Tonegawa S. (1994a) Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* **79**, 365-375.
- Aiba A., Kano M., Chen C., Stanton M. E., Fox G. D., Herrup K., Zwingman T. A. y Tonegawa S. (1994b) Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* **79**, 377-388.
- Albani-Torregrossa S., Attucci S., Marinozzi M., Pellicciari R., Moroni F. y Pellegrini-Giampietro D. E. (1999) Antagonist pharmacology of metabotropic glutamate receptors coupled to phospholipase D activation in adult rat hippocampus: focus on (2R,1'S,2'R,3'S)-2-(2'-carboxy-3'-phenylcyclopropyl)glycine versus 3, 5-dihydroxyphenylglycine. *Mol Pharmacol* **55**, 699-707.
- Albasanz J. L., Dalfó E., Ferrer I. y Martín M. (2005) Impaired metabotropic glutamate receptor/phospholipase C signaling pathway in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies correlates with stage of Alzheimer's-disease-related changes. *Neurobiol Dis* **20**, 685-693.
- Albasanz J. L., Fernández M. y Martín M. (2002a) Internalization of metabotropic glutamate receptor in C6 cells through clathrin-coated vesicles. *Brain Res Mol Brain Res* **99**, 54-66.
- Albasanz J. L., León D., Ruiz M. A., Fernández M. y Martín M. (2002b) Adenosine A1 receptor agonist treatment up-regulates rat brain metabotropic glutamate receptors. *Biochim Biophys Acta* **1593**, 69-75.
- Albasanz J. L., Perez S., Barrachina M., Ferrer I. y Martín M. (2008) Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **18**, 211-219.
- Albasanz J. L., Rodríguez A., Ferrer I. y Martín M. (2006) Adenosine A2A receptors are up-regulated in Pick's disease frontal cortex. *Brain Pathol* **16**, 249-255.
- Albasanz J. L., Rodríguez A., Ferrer I. y Martín M. (2007) Up-regulation of adenosine A1 receptors in frontal cortex from Pick's disease cases. *Eur J Neurosci* **26**, 3501-3508.
- Albasanz J. L., Ros M. y Martín M. (1997) Characterization of metabotropic glutamate receptors in rat C6 glioma cells. *Eur J Pharmacol* **326**, 85-91.
- Alexander S. P. y Millns P. J. (2001) [(3H)]ZM241385--an antagonist radioligand for adenosine A(2A) receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol* **411**, 205-210.
- Allen J. W., Eldadah B. A. y Faden A. I. (1999) Beta-amyloid-induced apoptosis of cerebellar granule cells and cortical neurons: exacerbation by selective inhibition of group I metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* **38**, 1243-1252.
- Almeida C. G., de Mendonça A., Cunha R. A. y Ribeiro J. A. (2003) Adenosine promotes neuronal recovery from reactive oxygen species induced lesion in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* **339**, 127-130.
- Alzheimer A., Stelzmann R. A., Schnitzlein H. N. y Murtagh F. R. (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* **8**, 429-431.
- Anderson C. M. y Swanson R. A. (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* **32**, 1-14.
- Andrade-Rozental A. F., Rozental R., Hopperstad M. G., Wu J. K., Vrionis F. D. y Spray D. C. (2000) Gap junctions: the "kiss of death" and the "kiss of life". *Brain Res Brain Res Rev* **32**, 308-315.
- Angulo E., Casadó V., Mallol J., Canela E. I., Viñals F., Ferrer I., Lluís C. y Franco R. (2003) A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathol* **13**, 440-451.
- Anjaneyulu M., Berent-Spillion A. y Russell J. W. (2008) Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) and diabetic neuropathy. *Curr Drug Targets* **9**, 85-93.
- Antonelli T., Ferraro L., Fuxe K., Finetti S., Fournier J., Tanganelli S., De Mattei M. y Tomasini M. C. (2004) Neurotensin enhances endogenous extracellular glutamate levels in primary cultures of rat cortical neurons: involvement of neurotensin receptor in NMDA induced excitotoxicity. *Cereb Cortex* **14**, 466-473.
- Anwyl R. (1999) Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* **29**, 83-120.
- Aramori I. y Nakanishi S. (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* **8**, 757-765.
- Arendash G. W., Schleif W., Rezai-Zadeh K., Jackson E. K., Zacharia L. C., Cracchiolo J. R., Shippy D. y Tan J. (2006) Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience* **142**, 941-952.
- Aronica E., van Vliet E. A., Mayboroda O. A., Troost D., da Silva F. H. y Gorter J. A. (2000) Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* **12**, 2333-2344.
- Arslan G. y Fredholm B. B. (2000) Stimulatory and inhibitory effects of adenosine A(2A) receptors on nerve growth factor-induced phosphorylation of extracellular regulated kinases 1/2 in PC12 cells. *Neurosci Lett* **292**, 183-186.
- Arundine M. y Tymianski M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* **34**, 325-337.
- Attucci S., Clodfelter G. V., Thibault O., Staton J., Moroni F., Landfield P. W. y Porter N. M. (2002) Group I metabotropic glutamate receptor inhibition selectively blocks a prolonged Ca(2+) elevation associated with age-dependent excitotoxicity. *Neuroscience* **112**, 183-194.
- Atwood C. S., Obrenovich M. E., Liu T., Chan H., Perry G., Smith M. A. y Martins R. N. (2003) Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Res Brain Res Rev* **43**, 1-16.
- Ayasolla K., Khan M., Singh A. K. y Singh I. (2004) Inflammatory mediator and beta-amyloid (25-35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E. *Free Radic Biol Med* **37**, 325-338.

B

- Baker J. G. y Hill S. J. (2007a) A comparison of the antagonist affinities for the Gi- and Gs-coupled states of the human adenosine A1-receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **320**, 218-228.

- Baker J. G. y Hill S. J. (2007b) Multiple GPCR conformations and signalling pathways: implications for antagonist affinity estimates. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 374-381.
- Barnham K. J., Masters C. L. y Bush A. I. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 205-214.
- Bartke A. (2008) New findings in gene knockout, mutant and transgenic mice. *Exp Gerontol* **43**, 11-14.
- Baskys A., Fang L. y Bayazitov I. (2005) Activation of neuroprotective pathways by metabotropic group I glutamate receptors: a potential target for drug discovery? *Ann N Y Acad Sci* **1053**, 55-73.
- Becher A. y McIlhinney R. A. (2005) Consequences of lipid raft association on G-protein-coupled receptor function. *Biochem Soc Symp*, 151-164.
- Behrens M. M., Strasser U., Heidinger V., Lobner D., Yu S. P., McDonald J. W., Won M. y Choi D. W. (1999) Selective activation of group II mGluRs with LY354740 does not prevent neuronal excitotoxicity. *Neuropharmacology* **38**, 1621-1630.
- Benda P., Lightbody J., Sato G., Levine L. y Sweet W. (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **161**, 370-371.
- Benington J. H., Kodali S. K. y Heller H. C. (1995) Stimulation of A1 adenosine receptors mimics the electroencephalographic effects of sleep deprivation. *Brain Res* **692**, 79-85.
- Benizri E., Ginouves A. y Berra E. (2008) The magic of the hypoxia-signaling cascade. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1133-1149.
- Benovic J. L., Pike L. J., Cerione R. A., Staniszewski C., Yoshimasa T., Codina J., Caron M. G. y Lefkowitz R. J. (1985) Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* **260**, 7094-7101.
- Benovic J. L., Strasser R. H., Caron M. G. y Lefkowitz R. J. (1986) Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2797-2801.
- Beraudi A., Bruno V., Battaglia G., Biagioni F., Rampello L., Nicoletti F. y Poli A. (2007) Pharmacological activation of mGlu2/3 metabotropic glutamate receptors protects retinal neurons against anoxic damage in the goldfish *Carassius auratus*. *Exp Eye Res* **84**, 544-552.
- Bergeron C., Muntasser S., Somerville M. J., Weyer L. y Percy M. E. (1994) Copper/zinc superoxide dismutase mRNA levels are increased in sporadic amyotrophic lateral sclerosis motoneurons. *Brain Res* **659**, 272-276.
- Berrendero F., Castañé A., Ledent C., Parmentier M., Maldonado R. y Valverde O. (2003) Increase of morphine withdrawal in mice lacking A2a receptors and no changes in CB1/A2a double knockout mice. *Eur J Neurosci* **17**, 315-324.
- Besong G., Battaglia G., D'Onofrio M., Di Marco R., Ngomba R. T., Storto M., Castiglione M., Mangano K., Busceti C. L., Nicoletti F. R., Bacon K., Tusche M., Valenti O., Conn P. J., Bruno V. y Nicoletti F. (2002) Activation of group III metabotropic glutamate receptors inhibits the production of RANTES in glial cell cultures. *J Neurosci* **22**, 5403-5411.
- Bezprozvanny I. y Mattson M. P. (2008) Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* **31**, 454-463.
- Biber K., Klotz K. N., Berger M., Gebicke-Harter P. J. y van Calcar D. (1997) Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *J Neurosci* **17**, 4956-4964.
- Birmingham K. (2002) Future of neuroprotective drugs in doubt. *Nat Med* **8**, 5.
- Björklund O., Halldner-Henriksson L., Yang J., Eriksson T. M., Jacobson M. A., Daré E. y Fredholm B. B. (2008) Decreased behavioral activation following caffeine, amphetamine and darkness in A3 adenosine receptor knock-out mice. *Physiol Behav* **95**, 668-676.
- Blaabjerg M., Fang L., Zimmer J. y Baskys A. (2003) Neuroprotection against NMDA excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors is associated with reduction of NMDA stimulated currents. *Exp Neurol* **183**, 573-580.
- Blanc E. M., Bruce-Keller A. J. y Mattson M. P. (1998) Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurochem* **70**, 958-970.
- Blessed G., Tomlinson B. E. y Roth M. (1968) The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* **114**, 797-811.
- Blum D., Gall D., Galas M. C., d'Alcantara P., Bantubungi K. y Schiffrmann S. N. (2002) The adenosine A1 receptor agonist adenosine amine congener exerts a neuroprotective effect against the development of striatal lesions and motor impairments in the 3-nitropropionic acid model of neurotoxicity. *J Neurosci* **22**, 9122-9133.
- Bohm M., Pieske B., Ungerer M. y Erdmann E. (1989) Characterization of A1 adenosine receptors in atrial and ventricular myocardium from diseased human hearts. *Circ Res* **65**, 1201-1211.
- Boss V. y Conn P. J. (1992) Metabotropic excitatory amino acid receptor activation stimulates phospholipase D in hippocampal slices. *J Neurochem* **59**, 2340-2343.
- Boudin H., Doan A., Xia J., Shigemoto R., Haganir R. L., Worley P. y Craig A. M. (2000) Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron* **28**, 485-497.
- Bourne H. R. (1997) How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 134-142.
- Braak H. y Braak E. (1998) Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* **53**, 127-140.
- Braak H. y Del Tredici K. (2004) Alzheimer's disease: intraneuronal alterations precede insoluble amyloid-beta formation. *Neurobiol Aging* **25**, 713-718; discussion 743-716.
- Brabet P., Pantaloni C., Rouot B., Toutant M., Garcia-Sainz A., Bockaert J. y Homburger V. (1988) Multiple species and isoforms of Bordetella pertussis toxin substrates. *Biochem Biophys Res Commun* **152**, 1185-1192.
- Brahimi-Horn C. y Pouyssegur J. (2006) The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer* **93**, E73-80.
- Brahimi-Horn C., Mazure N. y Pouyssegur J. (2005) Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* **17**, 1-9.
- Brambilla R., Cottini L., Fumagalli M., Ceruti S. y Abbracchio M. P. (2003) Blockade of A2A adenosine receptors prevents basic fibroblast growth factor-induced reactive astrogliosis in rat striatal primary astrocytes. *Glia* **43**, 190-194.
- Brodie C., Blumberg P. M. y Jacobson K. A. (1998) Activation of the A2A adenosine receptor inhibits nitric oxide production in glial cells. *FEBS Lett* **429**, 139-142.
- Bruno V., Battaglia G., Casabona G., Copani A., Caciagli F. y Nicoletti F. (1998) Neuroprotection by glial metabotropic glutamate receptors is mediated by transforming growth factor-beta. *J Neurosci* **18**, 9594-9600.
- Bruno V., Battaglia G., Copani A., Cespedes V. M., Galindo M. F., Cena V., Sanchez-Prieto J., Gasparini F., Kuhn R., Flor P. J. y Nicoletti F. (2001) An activity-dependent switch from facilitation to inhibition in the control of excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors. *Eur J Neurosci* **13**, 1469-1478.

- Bruno V., Battaglia G., Copani A., Giffard R. G., Raciti G., Raffaele R., Shinozaki H. y Nicoletti F. (1995b) Activation of class II or III metabotropic glutamate receptors protects cultured cortical neurons against excitotoxic degeneration. *Eur J Neurosci* **7**, 1906-1913.
- Bruno V., Battaglia G., Ksiazek I., van der Putten H., Catania M. V., Giuffrida R., Lukic S., Leonhardt T., Inderbitzin W., Gasparini F., Kuhn R., Hampson D. R., Nicoletti F. y Flor P. J. (2000a) Selective activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors is protective against excitotoxic neuronal death. *J Neurosci* **20**, 6413-6420.
- Bruno V., Copani A., Knopfel T., Kuhn R., Casabona G., Dell'Albani P., Condorelli D. F. y Nicoletti F. (1995a) Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacology* **34**, 1089-1098.
- Bruno V., Ksiazek I., Battaglia G., Lukic S., Leonhardt T., Sauer D., Gasparini F., Kuhn R., Nicoletti F. y Flor P. J. (2000b) Selective blockade of metabotropic glutamate receptor subtype 5 is neuroprotective. *Neuropharmacology* **39**, 2223-2230.
- Bruno V., Sureda F. X., Storto M., Casabona G., Caruso A., Knopfel T., Kuhn R. y Nicoletti F. (1997) The neuroprotective activity of group-II metabotropic glutamate receptors requires new protein synthesis and involves a glial-neuronal signaling. *J Neurosci* **17**, 1891-1897.
- Bruns R. F., Lu G. H. y Pugsley T. A. (1986) Characterization of the A2 adenosine receptor labeled by [3H]NECA in rat striatal membranes. *Mol Pharmacol* **29**, 331-346.
- Burnstock G. (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 575-590.
- Butterfield D. A. y Poon H. F. (2005) The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* **40**, 774-783.
- ### C
- Cai Z., Xiao F., Fratkin J. D. y Rhodes P. G. (1999) Protection of neonatal rat brain from hypoxic-ischemic injury by LY379268, a Group II metabotropic glutamate receptor agonist. *Neuroreport* **10**, 3927-3931.
- Calabresi P., Picconi B., Saulle E., Centonze D., Hainsworth A. H. y Bernardi G. (2000) Is pharmacological neuroprotection dependent on reduced glutamate release? *Stroke* **31**, 766-772; discussion 773.
- Calon F., Dridi M., Hornykiewicz O., Bedard P. J., Rajput A. H. y Di Paolo T. (2004) Increased adenosine A2A receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. *Brain* **127**, 1075-1084.
- Cambonie G., Laplanche L., Kamenka J. M. y Barbanel G. (2000) N-methyl-D-aspartate but not glutamate induces the release of hydroxyl radicals in the neonatal rat: modulation by group I metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci Res* **62**, 84-90.
- Cartmell J. y Schoepp D. D. (2000) Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem* **75**, 889-907.
- Cash A. D., Aliev G., Siedlak S. L., Nunomura A., Fujioka H., Zhu X., Raina A. K., Vinters H. V., Tabaton M., Johnson A. B., Paula-Barbosa M., Avila J., Jones P. K., Castellani R. J., Smith M. A. y Perry G. (2003) Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. *Am J Pathol* **162**, 1623-1627.
- Casolini P., Zuena A. R., Cinque C., Matteucci P., Alema G. S., Adriani W., Carpinelli G., Santoro F., Alleve E., Bosco P., Nicoletti F., Laviola G. y Catalani A. (2005) Sub-neurotoxic neonatal anoxia induces subtle behavioural changes and specific abnormalities in brain group-I metabotropic glutamate receptors in rats. *J Neurochem* **95**, 137-145.
- Castagne V., Gautschi M., Lefevre K., Posada A. y Clarke P. G. (1999) Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. *Prog Neurobiol* **59**, 397-423.
- Castillo C. A., Albasanz J. L., Fernández M. y Martín M. (2007) Endogenous expression of adenosine A1, A2 and A3 receptors in rat C6 glioma cells. *Neurochem Res* **32**, 1056-1070.
- Castillo C. A., León D., Ruiz M. A., Albasanz J. L. y Martín M. (2008) Modulation of adenosine A(1) and A(2A) receptors in C6 glioma cells during hypoxia: involvement of endogenous adenosine. *J Neurochem*.
- Cedazo-Minguez A., Popescu B. O., Ankarcrona M., Nishimura T. y Cowburn R. F. (2002) The presenilin 1 deltaE9 mutation gives enhanced basal phospholipase C activity and a resultant increase in intracellular calcium concentrations. *J Biol Chem* **277**, 36646-36655.
- Cha J. H., Makowiec R. L., Penney J. B. y Young A. B. (1990) L-[3H]Glutamate labels the metabotropic excitatory amino acid receptor in rodent brain. *Neurosci Lett* **113**, 78-83.
- Chen C. Y. y Bonham A. C. (2005) Glutamate suppresses GABA release via presynaptic metabotropic glutamate receptors at baroreceptor neurones in rats. *J Physiol* **562**, 535-551.
- Chen J. F., Huang Z., Ma J., Zhu J., Moratalla R., Standaert D., Moskowitz M. A., Fink J. S. y Schwarzschild M. A. (1999) A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J Neurosci* **19**, 9192-9200.
- Cheng J. T., Liu I. M., Juang S. W. y Jou S. B. (2000) Decrease of adenosine A-1 receptor gene expression in cerebral cortex of aged rats. *Neurosci Lett* **283**, 227-229.
- Chiamulera C., Epping-Jordan M. P., Zocchi A., Marcon C., Cottiny C., Tacconi S., Corsi M., Orzi F. y Conquet F. (2001) Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice. *Nat Neurosci* **4**, 873-874.
- Chiang M. C., Lee Y. C., Huang C. L. y Chern Y. (2005) cAMP-response element-binding protein contributes to suppression of the A2A adenosine receptor promoter by mutant Huntingtin with expanded polyglutamine residues. *J Biol Chem* **280**, 14331-14340.
- Choi D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623-634.
- Chomczynski P. y Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.
- Christofi F. L., Zhang H., Yu J. G., Guzman J., Xue J., Kim M., Wang Y. Z. y Cooke H. J. (2001) Differential gene expression of adenosine A1, A2a, A2b, and A3 receptors in the human enteric nervous system. *J Comp Neurol* **439**, 46-64.
- Ciccarelli R., Ballerini P., Sabatino G., Rathbone M. P., D'Onofrio M., Caciagli F. y Di Iorio P. (2001) Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int J Dev Neurosci* **19**, 395-414.
- Ciccarelli R., Di Iorio P., Bruno V., Battaglia G., D'Alimonte I., D'Onofrio M., Nicoletti F. y Caciagli F. (1999) Activation of A(1) adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100beta protein from cultured astrocytes. *Glia* **27**, 275-281.

- Ciruela F., Escriche M., Burgueno J., Angulo E., Casado V., Soloviev M. M., Canela E. I., Mallol J., Chan W. Y., Lluís C., McIlhinney R. A. y Franco R. (2001) Metabotropic glutamate 1 α and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes. *J Biol Chem* **276**, 18345-18351.
- Ciruela F., Saura C., Canela E. I., Mallol J., Lluís C. y Franco R. (1997) Ligand-induced phosphorylation, clustering, and desensitization of A1 adenosine receptors. *Mol Pharmacol* **52**, 788-797.
- Cobelens P. M., Kavelaars A., Heijnen C. J., Ribas C., Mayor F., Jr. y Penela P. (2007) Hydrogen peroxide impairs GRK2 translation via a calpain-dependent and cdk1-mediated pathway. *Cell Signal* **19**, 269-277.
- Coelho J. E., Rebola N., Fragata I., Ribeiro J. A., de Mendonça A. y Cunha R. A. (2006) Hypoxia-induced desensitization and internalization of adenosine A1 receptors in the rat hippocampus. *Neuroscience* **138**, 1195-1203.
- Conn P. J. y Pin J. P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 205-237.
- Cook L. B. y Hinkle P. M. (2004) Agonist-dependent up-regulation of thyrotrophin-releasing hormone receptor protein. *Biochem J* **380**, 815-821.
- Copani A., Bruno V., Battaglia G., Leanza G., Pellitteri R., Russo A., Stanzani S. y Nicoletti F. (1995) Activation of metabotropic glutamate receptors protects cultured neurons against apoptosis induced by beta-amyloid peptide. *Mol Pharmacol* **47**, 890-897.
- Cordeaux Y., Ijzerman A. P. y Hill S. J. (2004) Coupling of the human A1 adenosine receptor to different heterotrimeric G proteins: evidence for agonist-specific G protein activation. *Br J Pharmacol* **143**, 705-714.
- Cordey M. y Pike C. J. (2006) Conventional protein kinase C isoforms mediate neuroprotection induced by phorbol ester and estrogen. *J Neurochem* **96**, 204-217.
- Cormier R. J., Mennerick S., Melbostad H. y Zorumski C. F. (2001) Basal levels of adenosine modulate mGluR5 on rat hippocampal astrocytes. *Glia* **33**, 24-35.
- Corona J. C., Tovar-y-Romo L. B. y Tapia R. (2007) Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Ther Targets* **11**, 1415-1428.
- Corsi C., Melani A., Bianchi L., Pepeu G. y Pedata F. (1999) Striatal A2A adenosine receptors differentially regulate spontaneous and K⁺-evoked glutamate release in vivo in young and aged rats. *Neuroreport* **10**, 687-691.
- Corti C., Battaglia G., Molinaro G., Rizzo B., Pittaluga A., Corsi M., Mugnaini M., Nicoletti F. y Bruno V. (2007) The use of knock-out mice unravels distinct roles for mGlu2 and mGlu3 metabotropic glutamate receptors in mechanisms of neurodegeneration/neuroprotection. *J Neurosci* **27**, 8297-8308.
- Coyle J. T. y Puttfarcken P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-695.
- Crespo P., Xu N., Simonds W. F. y Gutkind J. S. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **369**, 418-420.
- Crossthwaite A. J., Hasan S. y Williams R. J. (2002) Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca(2+) and PI3-kinase. *J Neurochem* **80**, 24-35.
- Cullen P. J. y Lockyer P. J. (2002) Integration of calcium and Ras signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 339-348.
- Cunha G. M., Canas P. M., Melo C. S., Hockemeyer J., Muller C. E., Oliveira C. R. y Cunha R. A. (2008) Adenosine A2A receptor blockade prevents memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. *Exp Neurol* **210**, 776-781.
- Cunha R. A. (2001) Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* **38**, 107-125.
- Cunha R. A. (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A(2A) receptor blockade. *Purinergic Signal* **1**, 111-134.
- Cunha R. A. (2008) Different cellular sources and different roles of adenosine: A1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A2A receptor-mediated facilitation of plasticity. *Neurochem Int* **52**, 65-72.
- Cunha R. A. y Ribeiro J. A. (2000) Adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the rat hippocampus requires protein kinase C but not protein kinase A activation. *Neurosci Lett* **289**, 127-130.
- Cunha R. A., Almeida T. y Ribeiro J. A. (2001a) Parallel modification of adenosine extracellular metabolism and modulatory action in the hippocampus of aged rats. *J Neurochem* **76**, 372-382.
- Cunha R. A., Constantino M. C., Sebastião A. M. y Ribeiro J. A. (1995) Modification of A1 and A2a adenosine receptor binding in aged striatum, hippocampus and cortex of the rat. *Neuroreport* **6**, 1583-1588.
- Cunha R. A., Constantino M. D., Fonseca E. y Ribeiro J. A. (2001b) Age-dependent decrease in adenosine A1 receptor binding sites in the rat brain. Effect of cis unsaturated free fatty acids. *Eur J Biochem* **268**, 2939-2947.
- Cunha R. A., Johansson B., Constantino M. D., Sebastião A. M. y Fredholm B. B. (1996) Evidence for high-affinity binding sites for the adenosine A2A receptor agonist [³H] CGS 21680 in the rat hippocampus and cerebral cortex that are different from striatal A2A receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **353**, 261-271.
- Cunha-Reis D., Ribeiro J. A. y Sebastião A. M. (2008) A1 and A2A receptor activation by endogenous adenosine is required for VIP enhancement of K⁺-evoked [³H]-GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neurosci Lett* **430**, 207-212.
- Cutler R. G., Kelly J., Storie K., Pedersen W. A., Tammara A., Hatanpää K., Troncoso J. C. y Mattson M. P. (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2070-2075.
- Cutler R. G., Pedersen W. A., Camandola S., Rothstein J. D. y Mattson M. P. (2002) Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **52**, 448-457.

D

- Da Settimo F., Primofiore G., Taliani S., La Motta C., Novellino E., Greco G., Lavecchia A., Cosimelli B., Iadanza M., Klotz K. N., Tuscano D., Trincavelli M. L. y Martini C. (2004) A1 adenosine receptor antagonists, 3-aryl[1,2,4]triazino[4,3-a]benzimidazol-4-(10H)-ones (ATBIs) and N-alkyl and N-acyl-[7-substituted-2-phenylimidazo[1,2-a][1,3,5]triazin-4-yl]amines (ITAs): Different recognition of bovine and human binding sites. *Drug Develop Res* **63**, 1-7.
- Dalfó E., Albasanz J. L., Martín M. y Ferrer I. (2004) Abnormal metabotropic glutamate receptor expression and signaling in the cerebral cortex in diffuse Lewy body disease is associated with irregular alpha-synuclein/phospholipase C (PLC β 1) interactions. *Brain Pathol* **14**, 388-398.
- Dall'Igna O. P., Fett P., Gomes M. W., Souza D. O., Cunha R. A. y Lara D. R. (2007) Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol* **203**, 241-245.

- Dall'Igna O. P., Porciuncula L. O., Souza D. O., Cunha R. A. y Lara D. R. (2003) Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol* **138**, 1207-1209.
- Daly J. W. (1984) Forskolin, adenylate cyclase, and cell physiology: an overview. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* **17**, 81-89.
- Dang C. V., Kim J. W., Gao P. y Yustein J. (2008) The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 51-56.
- Danial N. N. y Korsmeyer S. J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219.
- Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. y Greenberg M. E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241.
- Davies M. N., Gloriam D. E., Secker A., Freitas A. A., Mendoa M., Timmis J. y Flower D. R. (2007) Proteomic applications of automated GPCR classification. *Proteomics* **7**, 2800-2814.
- Davies M. N., Secker A., Halling-Brown M., Moss D. S., Freitas A. A., Timmis J., Clark E. y Flower D. R. (2008) GPCRTree: online hierarchical classification of GPCR function. *BMC Res Notes* **1**, 67.
- Dawson T. M. y Ginty D. D. (2002) CREB family transcription factors inhibit neuronal suicide. *Nat Med* **8**, 450-451.
- De Cesare D., Fimia G. M. y Sassone-Corsi P. (1999) Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* **24**, 281-285.
- De Felice F. G., Wasilewska-Sampaio A. P., Barbosa A. C., Gomes F. C., Klein W. L. y Ferreira S. T. (2007) Cyclic AMP enhancers and Abeta oligomerization blockers as potential therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **4**, 263-271.
- De Leo M. E., Borrello S., Passantino M., Palazzotti B., Mordente A., Daniele A., Filippini V., Galeotti T. y Masullo C. (1998) Oxidative stress and overexpression of manganese superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **250**, 173-176.
- de Mendonça A., Sebastião A. M. y Ribeiro J. A. (1995) Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A1 receptor activation. *Neuroreport* **6**, 1097-1100.
- de Mendonça A., Sebastião A. M. y Ribeiro J. A. (2000) Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev* **33**, 258-274.
- Deckert J., Abel F., Kunig G., Hartmann J., Senitz D., Maier H., Ransmayr G. y Riederer P. (1998) Loss of human hippocampal adenosine A1 receptors in dementia: evidence for lack of specificity. *Neurosci Lett* **244**, 1-4.
- Dehnhardt M., Palm C., Vieten A., Bauer A. y Pietrzyk U. (2007) Quantifying the A1AR distribution in peritumoural zones around experimental F98 and C6 rat brain tumours. *J Neurooncol* **85**, 49-63.
- Delgado-Esteban M., Almeida A. y Medina J. M. (2002) Tetrahydrobiopterin deficiency increases neuronal vulnerability to hypoxia. *J Neurochem* **82**, 1148-1159.
- Deng W., Wang H., Rosenberg P. A., Volpe J. J. y Jensen F. E. (2004) Role of metabotropic glutamate receptors in oligodendrocyte excitotoxicity and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7751-7756.
- Desai M. K., Sudol K. L., Janelins M. C., Mastrangelo M. A., Frazer M. E. y Bowers W. J. (2009) Triple-transgenic Alzheimer's disease mice exhibit region-specific abnormalities in brain myelination patterns prior to appearance of amyloid and tau pathology. *Glia* **57**, 54-65.
- Deussen A. (2000) Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **362**, 351-363.
- DeWire S. M., Ahn S., Lefkowitz R. J. y Shenoy S. K. (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* **69**, 483-510.
- Dhami G. K. y Ferguson S. S. (2006) Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacol Ther* **111**, 260-271.
- Dhawan N., Puangco J. y Jandial R. (2008) In search of a treatment for Alzheimer's disease and potential immunosuppressive therapeutic interventions. *Neuro Endocrinol Lett* **29**, 410-420.
- Dickenson J. M., Blank J. L. y Hill S. J. (1998) Human adenosine A1 receptor and P2Y2-purinoreceptor-mediated activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in transfected CHO cells. *Br J Pharmacol* **124**, 1491-1499.
- Dineley K. T., Westerman M., Bui D., Bell K., Ashe K. H. y Sweatt J. D. (2001) Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* **21**, 4125-4133.
- Dingledine R., Borges K., Bowie D. y Traynelis S. F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51**, 7-61.
- Dixon A. K., Gubitz A. K., Sirinathsinghi D. J., Richardson P. J. y Freeman T. C. (1996) Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* **118**, 1461-1468.
- Doherty A. J., Coutinho V., Collingridge G. L. y Henley J. M. (1999) Rapid internalization and surface expression of a functional, fluorescently tagged G-protein-coupled glutamate receptor. *Biochem J* **341** (Pt 2), 415-422.
- Dong Z., Wang J. Z., Yu F. y Venkatachalam M. A. (2003) Apoptosis-resistance of hypoxic cells: multiple factors involved and a role for IAP-2. *Am J Pathol* **163**, 663-671.
- D'Onofrio M., Cuomo L., Battaglia G., Ngomba R. T., Storto M., Kingston A. E., Orzi F., De Blasi A., Di Iorio P., Nicoletti F. y Bruno V. (2001) Neuroprotection mediated by glial group-II metabotropic glutamate receptors requires the activation of the MAP kinase and the phosphatidylinositol-3-kinase pathways. *J Neurochem* **78**, 435-445.
- Dorsam R. T. y Gutkind J. S. (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 79-94.
- Du Y., Chen C. P., Tseng C. Y., Eisenberg Y. y Firestein B. L. (2007) Astroglia-mediated effects of uric acid to protect spinal cord neurons from glutamate toxicity. *Glia* **55**, 463-472.
- Duerson K., Woltjer R. L., Mookherjee P., Leverenz J. B., Montine T. J., Bird T. D., Pow D. V., Rauen T. y Cook D. G. (2008) Detergent-Insoluble EAAC1/EAAT3 Aberrantly Accumulates in Hippocampal Neurons of Alzheimer's Disease Patients. *Brain Pathol*.
- Dumuis A., Pin J. P., Oomagari K., Sebben M. y Bockaert J. (1990) Arachidonic acid released from striatal neurons by joint stimulation of ionotropic and metabotropic quisqualate receptors. *Nature* **347**, 182-184.
- Dunwiddie T. V. y Masino S. A. (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **24**, 31-55.

E

- Edinger A. L. y Thompson C. B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 663-669.
- Ekonomou A., Pagonopoulou O. y Angelatou F. (2000) Age-dependent changes in adenosine A1 receptor and uptake site binding in the mouse brain: an autoradiographic study. *J Neurosci Res* **60**, 257-265.
- El Jamali A., Rachdaoui N., Dib K. y Corrèze C. (1998) Cyclic AMP regulation of G(i alpha2) and G(i alpha3) mRNAs and proteins in astroglial cells. *J Neurochem* **71**, 2271-2277.
- El Yacoubi M., Ledent C., Parmentier M., Costentin J. y Vaugeois J. M. (2003) Caffeine reduces hypnotic effects of alcohol through adenosine A2A receptor blockade. *Neuropharmacology* **45**, 977-985.

- Endoh T. (2004) Characterization of modulatory effects of postsynaptic metabotropic glutamate receptors on calcium currents in rat nucleus tractus solitarius. *Brain Res* **1024**, 212-224.
- Esch F. S., Keim P. S., Beattie E. C., Blacher R. W., Culwell A. R., Oltersdorf T., McClure D. y Ward P. J. (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* **248**, 1122-1124.
- Escrive M., Burgueno J., Ciruela F., Canela E. I., Mallol J., Enrich C., Lluís C. y Franco R. (2003) Ligand-induced caveolae-mediated internalization of A1 adenosine receptors: morphological evidence of endosomal sorting and receptor recycling. *Exp Cell Res* **285**, 72-90.
- F**
- Fabiato A. y Fabiato F. (1977) Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* **40**, 119-129.
- Falcón J., Privat K. y Ravault J. P. (1997) Binding of an adenosine A1 receptor agonist and adenosine A1 receptor antagonist to sheep pineal membranes. *Eur J Pharmacol* **337**, 325-331.
- Fastbom J., Pazos A. y Palacios J. M. (1987) The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neuroscience* **22**, 813-826.
- Fatokun A. A., Stone T. W. y Smith R. A. (2006) Hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 cells: The effects of glutamate and protection by purines. *Bone* **39**, 542-551.
- Fatokun A. A., Stone T. W. y Smith R. A. (2007) Cell death in rat cerebellar granule neurons induced by hydrogen peroxide in vitro: mechanisms and protection by adenosine receptor ligands. *Brain Res* **1132**, 193-202.
- Fedorova I. M., Jacobson M. A., Basile A. y Jacobson K. A. (2003) Behavioral characterization of mice lacking the A3 adenosine receptor: sensitivity to hypoxic neurodegeneration. *Cell Mol Neurobiol* **23**, 431-447.
- Feoktistov I., Goldstein A. E. y Biaggioni I. (1999) Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase kinase in adenosine A2B receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells. *Mol Pharmacol* **55**, 726-734.
- Ferguson S. S., Zhang J., Barak L. S. y Caron M. G. (1998) Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci* **62**, 1561-1565.
- Fernández M., Svenningsson P. y Fredholm B. B. (1996) Adaptive changes in adenosine receptors following long-term treatment with the adenosine receptor agonist R-phenylisopropyl adenosine. *Life Sci* **58**, 769-776.
- Ferroni S., Marchini C., Ogata T. y Schubert P. (2002) Recovery of deficient cholinergic calcium signaling by adenosine in cultured rat cortical astrocytes. *J Neurosci Res* **68**, 615-621.
- Figler R. A., Lindorfer M. A., Graber S. G., Garrison J. C. y Linden J. (1997) Reconstitution of bovine A1 adenosine receptors and G proteins in phospholipid vesicles: betagamma-subunit composition influences guanine nucleotide exchange and agonist binding. *Biochemistry* **36**, 16288-16299.
- Finkbeiner S. y Greenberg M. E. (1998) Ca²⁺ channel-regulated neuronal gene expression. *J Neurobiol* **37**, 171-189.
- Ford M. S., Nie Z., Whitworth C., Rybak L. P. y Ramkumar V. (1997) Up-regulation of adenosine receptors in the cochlea by cisplatin. *Hear Res* **111**, 143-152.
- Foulkes N. S. y Sassone-Corsi P. (1992) More is better: activators and repressors from the same gene. *Cell* **68**, 411-414.
- Fredholm B. B. (1997) Adenosine and neuroprotection. *Int Rev Neurobiol* **40**, 259-280.
- Fredholm B. B. (2007) Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* **14**, 1315-1323.
- Fredholm B. B., Battig K., Holmen J., Nehlig A. y Zvartau E. E. (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* **51**, 83-133.
- Fredholm B. B., Chen J. F., Cunha R. A., Svenningsson P. y Vaugeois J. M. (2005a) Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* **63**, 191-270.
- Fredholm B. B., Chen J. F., Masino S. A. y Vaugeois J. M. (2005b) Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 385-412.
- Fredholm B. B., Chern Y., Franco R. y Sitkovsky M. (2007) Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Prog Neurobiol* **83**, 263-276.
- Fredholm B. B., Cunha R. A. y Svenningsson P. (2003) Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Curr Top Med Chem* **3**, 413-426.
- Fredholm B. B., Johansson B., Lindstrom K. y Wahlstrom G. (1998) Age-dependent changes in adenosine receptors are not modified by life-long intermittent alcohol administration. *Brain Res* **791**, 177-185.
- Fredholm B. B., Lindstrom K. y Wallman-Johansson A. (1994) Propentofylline and other adenosine transport inhibitors increase the efflux of adenosine following electrical or metabolic stimulation of rat hippocampal slices. *J Neurochem* **62**, 563-573.
- Fredriksson R., Lagerstrom M. C., Lundin L. G. y Schioth H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**, 1256-1272.
- Freixes M., Rodriguez A., Dalfo E. y Ferrer I. (2006) Oxidation, glycoxidation, lipoxidation, nitration, and responses to oxidative stress in the cerebral cortex in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging* **27**, 1807-1815.
- Frenguelli B. G., Llaudet E. y Dale N. (2003) High-resolution real-time recording with microelectrode biosensors reveals novel aspects of adenosine release during hypoxia in rat hippocampal slices. *J Neurochem* **86**, 1506-1515.
- Frizzo M. E., Lara D. R., Dahm K. C., Prokopiuk A. S., Swanson R. A. y Souza D. O. (2001) Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport* **12**, 879-881.
- Fujibayashi Y., Waki A., Wada K., Ueno M., Magata Y., Yonekura Y., Konishi J., Takeda T. y Yokoyama A. (1994) Differential aging pattern of cerebral accumulation of radiolabeled glucose and amino acid in the senescence accelerated mouse (SAM), a new model for the study of memory impairment. *Biol Pharm Bull* **17**, 102-105.
- G**
- Gardoni F. y Di Luca M. (2006) New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse. *Eur J Pharmacol* **545**, 2-10.
- Gee C. E. y Lacaille J. C. (2004) Group I metabotropic glutamate receptor actions in oriens/alveus interneurons of rat hippocampal CA1 region. *Brain Res* **1000**, 92-101.
- Gentry C. L. y Lukas R. J. (2002) Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **1**, 359-385.
- George S. R., O'Dowd B. F. y Lee S. P. (2002) G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 808-820.
- Geraets L., Moonen H. J., Wouters E. F., Bast A. y Hageman G. J. (2006) Caffeine metabolites are inhibitors of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose)polymerase-1 at physiological concentrations. *Biochem Pharmacol* **72**, 902-910.

- Gessi S., Merighi S., Varani K., Leung E., Mac Lennan S. y Borea P. A. (2008) The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. *Pharmacol Ther* **117**, 123-140.
- Giardina S. F., Mikami M., Goubaeva F. y Yang J. (2007) Connexin 43 confers resistance to hydrogen peroxide-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **362**, 747-752.
- Gil J. M. y Rego A. C. (2008) Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* **27**, 2803-2820.
- Giménez-Llort L., Fernández-Teruel A., Escorihuela R. M., Fredholm B. B., Tobeña A., Pekny M. y Johansson B. (2002) Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur J Neurosci* **16**, 547-550.
- Glenner G. G. y Wong C. W. (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* **122**, 1131-1135.
- Globus M. Y., Busto R., Dietrich W. D., Martinez E., Valdes I. y Ginsberg M. D. (1989) Direct evidence for acute and massive norepinephrine release in the hippocampus during transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **9**, 892-896.
- Gorman A. M., McGowan A., O'Neill C. y Cotter T. (1996) Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *J Neurol Sci* **139 Suppl**, 45-52.
- Greenamyre J. T. y Young A. B. (1989) Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **10**, 593-602.
- Greene R. W. y Haas H. L. (1991) The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* **36**, 329-341.
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y. C., Zaidi M. S. y Wisniewski H. M. (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* **261**, 6084-6089.
- Gu Q. B., Zhao J. X., Fei J. y Schwarz W. (2004) Modulation of Na(+),K(+) pumping and neurotransmitter uptake by beta-amyloid. *Neuroscience* **126**, 61-67.
- ## H
- Hanoune J. y Defer N. (2001) Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 145-174.
- Hanyaloglu A. C. y von Zastrow M. (2008) Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**, 537-568.
- Hara A. y Abiko Y. (1995) Protective effect of hypoxia on mechanical and metabolic changes induced by hydrogen peroxide in rat hearts. *Am J Physiol* **268**, H614-620.
- Harada J. y Sugimoto M. (1999) Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. *Brain Res* **842**, 311-323.
- Hardingham G. E. y Bading H. (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* **26**, 81-89.
- Hardingham G. E., Fukunaga Y. y Bading H. (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* **5**, 405-414.
- Hardy J. y Selkoe D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356.
- Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298-300.
- Haughey N. J., Cutler R. G., Tamara A., McArthur J. C., Vargas D. L., Pardo C. A., Turchan J., Nath A. y Mattson M. P. (2004) Perturbation of sphingolipid metabolism and ceramide production in HIV-dementia. *Ann Neurol* **55**, 257-267.
- Hausdorff W. P., Bouvier M., O'Dowd B. F., Irons G. P., Caron M. G. y Lefkowitz R. J. (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* **264**, 12657-12665.
- Hayashi T. (1952) A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn J Physiol* **3**, 46-64.
- Hejmadi M. V., Dajas-Bailador F., Barnes S. M., Jones B. y Wonnacott S. (2003) Neuroprotection by nicotine against hypoxia-induced apoptosis in cortical cultures involves activation of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Mol Cell Neurosci* **24**, 779-786.
- Hermans E. y Challiss R. A. (2001) Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochem J* **359**, 465-484.
- Herrero I., Miras-Portugal M. T. y Sanchez-Prieto J. (1998) Functional switch from facilitation to inhibition in the control of glutamate release by metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* **273**, 1951-1958.
- Hettinger B. D., Leid M. y Murray T. F. (1998) Cyclopentyladenosine-induced homologous down-regulation of A1 adenosine receptors (A1AR) in intact neurons is accompanied by receptor sequestration but not a reduction in A1AR mRNA expression or G protein alpha-subunit content. *J Neurochem* **71**, 221-230.
- Hettinger-Smith B. D., Leid M. y Murray T. F. (1996) Chronic exposure to adenosine receptor agonists and antagonists reciprocally regulates the A1 adenosine receptor-adenylyl cyclase system in cerebellar granule cells. *J Neurochem* **67**, 1921-1930.
- Heuss C., Scanziani M., Gähwiler B. H. y Gerber U. (1999) G-protein-independent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* **2**, 1070-1077.
- Hisaoka K., Maeda N., Tsuchioka M. y Takebayashi M. (2008) Antidepressants induce acute CREB phosphorylation and CRE-mediated gene expression in glial cells: a possible contribution to GDNF production. *Brain Res* **1196**, 53-58.
- Hofer S. M., Berg S. y Era P. (2003) Evaluating the interdependence of aging-related changes in visual and auditory acuity, balance, and cognitive functioning. *Psychol Aging* **18**, 285-305.
- Horn F., Bettler E., Oliveira L., Campagne F., Cohen F. E. y Vriend G. (2003) GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res* **31**, 294-297.
- Houamed K. M., Kuijper J. L., Gilbert T. L., Haldeman B. A., O'Hara P. J., Mulvihill E. R., Almers W. y Hagen F. S. (1991) Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* **252**, 1318-1321.
- Huang N. K. (2003) Adenosine A2A receptors regulate oxidative stress formation in rat pheochromocytoma PC12 cells during serum deprivation. *Neurosci Lett* **350**, 127-131.
- Hukovic N., Panetta R., Kumar U. y Patel Y. C. (1996) Agonist-dependent regulation of cloned human somatostatin receptor types 1-5 (hSSTR1-5): subtype selective internalization or upregulation. *Endocrinology* **137**, 4046-4049.
- Hung S. C., Pochampally R. R., Chen S. C., Hsu S. C. y Prockop D. J. (2007) Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* **25**, 2363-2370.
- ## I
- Iacovelli L., Capobianco L., Iula M., Di Giorgi Gerevini V., Picascia A., Blahos J., Melchiorri D., Nicoletti F. y De Blasi A. (2004) Regulation of mGlu4 metabotropic glutamate receptor signaling by type-2 G-protein coupled receptor kinase (GRK2). *Mol Pharmacol* **65**, 1103-1110.

- Iglesias I., Castillo C. A., León D., Ruiz M. A., Albasanz J. L. y Martín M. (2007) Metabotropic glutamate receptor/phospholipase C system in female rat heart. *Brain Res* **1153**, 1-11.
- Iglesias I., León D., Ruiz M. A., Albasanz J. L. y Martín M. (2006) Chronic intake of caffeine during gestation down regulates metabotropic glutamate receptors in maternal and fetal rat heart. *Amino Acids* **30**, 257-266.
- Ikonomidou C. y Turski L. (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol* **1**, 383-386.
- Insel P. A. y Ostrom R. S. (2003) Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cell Mol Neurobiol* **23**, 305-314.
- Iqbal K. y Grundke-Iqbal I. (2006) Discoveries of tau, abnormally hyperphosphorylated tau and others of neurofibrillary degeneration: a personal historical perspective. *J Alzheimers Dis* **9**, 219-242.
- Ishiwata K., Mishina M., Kimura Y., Oda K., Sasaki T. y Ishii K. (2005) First visualization of adenosine A(2A) receptors in the human brain by positron emission tomography with [¹¹C]TMSX. *Synapse* **55**, 133-136.
- Iversen L. L., Mortishire-Smith R. J., Pollack S. J. y Shearman M. S. (1995) The toxicity in vitro of beta-amyloid protein. *Biochem J* **311** (Pt 1), 1-16.
- J**
- Jaakola V. P., Griffith M. T., Hanson M. A., Cherezov V., Chien E. Y., Lane J. R., Ijzerman A. P. y Stevens R. C. (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **322**, 1211-1217.
- Jacob C. P., Koutsilieri E., Bartl J., Neuen-Jacob E., Arzberger T., Zander N., Ravid R., Roggendorf W., Riederer P. y Grunblatt E. (2007) Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **11**, 97-116.
- Jang Y. C. y Remmen H. V. (2009) The mitochondrial theory of aging: Insight from transgenic and knockout mouse models. *Exp Gerontol*.
- Jezek P. y Hlavatá L. (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 2478-2503.
- Ji X. D. y Jacobson K. A. (1999) Use of the triazolotriazine [3H]ZM 241385 as a radioligand at recombinant human A2B adenosine receptors. *Drug Des Discov* **16**, 217-226.
- Johansson B., Halldner L., Dunwiddie T. V., Masino S. A., Poelchen W., Gimenez-Llort L., Escorihuela R. M., Fernandez-Teruel A., Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X. J., Hardemark A., Betsholtz C., Herlenius E. y Fredholm B. B. (2001) Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9407-9412.
- Jolly-Tornetta C., Gao Z. Y., Lee V. M. y Wolf B. A. (1998) Regulation of amyloid precursor protein secretion by glutamate receptors in human Ntera 2 neurons. *J Biol Chem* **273**, 14015-14021.
- Jones D. T. y Reed R. R. (1987) Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium. *J Biol Chem* **262**, 14241-14249.
- Jones P. A., Smith R. A. y Stone T. W. (1998) Protection against kainate-induced excitotoxicity by adenosine A2A receptor agonists and antagonists. *Neuroscience* **85**, 229-237.
- Jong Y. J., Kumar V., Kingston A. E., Romano C. y O'Malley K. L. (2005) Functional metabotropic glutamate receptors on nuclei from brain and primary cultured striatal neurons. Role of transporters in delivering ligand. *J Biol Chem* **280**, 30469-30480.
- Josselyn S. A. y Nguyen P. V. (2005) CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**, 481-497.
- K**
- Kabogo D., Rauw G., Amritraj A., Baker G. y Kar S. (2008) beta-Amyloid-related peptides potentiate K(+)-evoked glutamate release from adult rat hippocampal slices. *Neurobiol Aging*.
- Kacimi R., Moalic J. M., Aldashev A., Vatner D. E., Richalet J. P. y Crozatier B. (1995) Differential regulation of G protein expression in rat hearts exposed to chronic hypoxia. *Am J Physiol* **269**, H1865-1873.
- Kalda A. y Zharkovsky A. (1999) Metabotropic glutamate receptor agonists protect from oxygen-glucose deprivation- and colchicine-induced apoptosis in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience* **92**, 7-14.
- Kalda A., Kaasik A., Vassiljev V., Pokk P. y Zharkovsky A. (2000) Neuroprotective action of group I metabotropic glutamate receptor agonists against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal death. *Brain Res* **853**, 370-373.
- Kammermeier P. J. y Ikeda S. R. (1999) Expression of RGS2 alters the coupling of metabotropic glutamate receptor 1a to M-type K+ and N-type Ca2+ channels. *Neuron* **22**, 819-829.
- Kang J., Lemaire H. G., Unterbeck A., Salbaum J. M., Masters C. L., Grzeschik K. H., Multhaup G., Beyreuther K. y Muller-Hill B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-736.
- Kaur B., Khwaja F. W., Severson E. A., Matheny S. L., Brat D. J. y Van Meir E. G. (2005) Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* **7**, 134-153.
- Kelly E., Bailey C. P. y Henderson G. (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol* **153** Suppl 1, S379-388.
- Kenneth N. S. y Rocha S. (2008) Regulation of gene expression by hypoxia. *Biochem J* **414**, 19-29.
- Kerr J. F., Wyllie A. H. y Currie A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.
- Kim S. Y., Ang S. L., Bloch D. B., Bloch K. D., Kawahara Y., Tolman C., Lee R., Seidman J. G. y Neer E. J. (1988) Identification of cDNA encoding an additional alpha subunit of a human GTP-binding protein: expression of three alpha i subtypes in human tissues and cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4153-4157.
- Kimelberg H. K., Pang S. y Treble D. H. (1989) Excitatory amino acid-stimulated uptake of 22Na+ in primary astrocyte cultures. *J Neurosci* **9**, 1141-1149.
- Kitakaze M., Minamino T., Node K., Komamura K., Inoue M., Hori M. y Kamada T. (1996) Activation of ecto-5'-nucleotidase by protein kinase C attenuates irreversible cellular injury due to hypoxia and reoxygenation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **28**, 1945-1955.
- Kitamura Y., Zhao X. H., Ohnuki T., Takei M. y Nomura Y. (1992) Age-related changes in transmitter glutamate and NMDA receptor/channels in the brain of senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett* **137**, 169-172.
- Klaasse E. C., Ijzerman A. P., de Grip W. J. y Beukers M. W. (2008) Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic Signal* **4**, 21-37.
- Klotz K. N., Lohse M. J., Schwabe U., Cristalli G., Vittori S. y Grifantini M. (1989) 2-Chloro-N6-[3H]cyclopentyladenosine ([3H]CCPA)--a high affinity agonist radioligand for A1 adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **340**, 679-683.
- Kobayashi S. y Millhorn D. E. (1999) Stimulation of expression for the adenosine A2A receptor gene by hypoxia in PC12 cells. A potential role in cell protection. *J Biol Chem* **274**, 20358-20365.
- Kobayashi S. y Millhorn D. E. (2001) Hypoxia regulates glutamate metabolism and membrane transport in rat PC12 cells. *J Neurochem* **76**, 1935-1948.

- Kobayashi S., Beitner-Johnson D., Conforti L. y Millhorn D. E. (1998) Chronic hypoxia reduces adenosine A2A receptor-mediated inhibition of calcium current in rat PC12 cells via downregulation of protein kinase A. *J Physiol* **512** (Pt 2), 351-363.
- Kolakowski L. F., Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **2**, 1-7.
- Kong T., Westerman K. A., Faigle M., Eltzschig H. K. y Colgan S. P. (2006) HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *Faseb J* **20**, 2242-2250.
- Kumagai Y. y Matsui Y. (1991) Output, tissue levels, and synthesis of acetylcholine during and after transient forebrain ischemia in the rat. *J Neurochem* **56**, 1169-1173.
- Kumar V. B., Franko M. W., Farr S. A., Armbricht H. J. y Morley J. E. (2000) Identification of age-dependent changes in expression of senescence-accelerated mouse (SAMP8) hippocampal proteins by expression array analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 657-661.
- Küst B. M., Biber K., van Calker D. y Gebicke-Haerter P. J. (1999) Regulation of K⁺ channel mRNA expression by stimulation of adenosine A2a-receptors in cultured rat microglia. *Glia* **25**, 120-130.
- L**
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LaFerla F. M., Green K. N. y Oddo S. (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **8**, 499-509.
- Lafon-Cazal M., Fagni L., Guiraud M. J., Mary S., Lerner-Natoli M., Pin J. P., Shigemoto R. y Bockaert J. (1999a) mGluR7-like metabotropic glutamate receptors inhibit NMDA-mediated excitotoxicity in cultured mouse cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci* **11**, 663-672.
- Lafon-Cazal M., Vienne G., Kuhn R., Malitschek B., Pin J. P., Shigemoto R. y Bockaert J. (1999b) mGluR7-like receptor and GABA(B) receptor activation enhance neurotoxic effects of N-methyl-D-aspartate in cultured mouse striatal GABAergic neurones. *Neuropharmacology* **38**, 1631-1640.
- Latini S. y Pedata F. (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* **79**, 463-484.
- Ledent C., Vaugeois J. M., Schiffmann S. N., Pedrazzini T., El Yacoubi M., Vanderhaeghen J. J., Costentin J., Heath J. K., Vassart G. y Parmentier M. (1997) Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* **388**, 674-678.
- Lee B., Butcher G. Q., Hoyt K. R., Impey S. y Obrietan K. (2005) Activity-dependent neuroprotection and cAMP response element-binding protein (CREB): kinase coupling, stimulus intensity, and temporal regulation of CREB phosphorylation at serine 133. *J Neurosci* **25**, 1137-1148.
- Lee F. S. y Chao M. V. (2001) Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3555-3560.
- Lee H. G., Ogawa O., Zhu X., O'Neill M. J., Petersen R. B., Castellani R. J., Ghanbari H., Perry G. y Smith M. A. (2004a) Aberrant expression of metabotropic glutamate receptor 2 in the vulnerable neurons of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **107**, 365-371.
- Lee H. G., Zhu X., Casadesus G., Pallàs M., Camins A., O'Neill M. J., Nakanishi S., Perry G. y Smith M. A. (2009) The effect of mGluR2 activation on signal transduction pathways and neuronal cell survival. *Brain Res* **1249**, 244-250.
- Lee H. K., Choi S. S., Han K. J., Han E. J. y Suh H. W. (2004b) Roles of adenosine receptors in the regulation of kainic acid-induced neurotoxic responses in mice. *Brain Res Mol Brain Res* **125**, 76-85.
- Lee H. T. y Emala C. W. (2002) Adenosine attenuates oxidant injury in human proximal tubular cells via A(1) and A(2a) adenosine receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F844-852.
- Lee J. M., Grabb M. C., Zipfel G. J. y Choi D. W. (2000a) Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* **106**, 723-731.
- Lee J. M., Zipfel G. J. y Choi D. W. (1999) The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* **399**, A7-14.
- Lee K. S., Tetzlaff W. y Kreutzberg G. W. (1986) Rapid down regulation of hippocampal adenosine receptors following brief anoxia. *Brain Res* **380**, 155-158.
- Lee R. K. y Wurtman R. J. (1997) Metabotropic glutamate receptors increase amyloid precursor protein processing in astrocytes: inhibition by cyclic AMP. *J Neurochem* **68**, 1830-1835.
- Lee R. K., Araki W. y Wurtman R. J. (1997) Stimulation of amyloid precursor protein synthesis by adrenergic receptors coupled to cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5422-5426.
- Lee R. K., Jimenez J., Cox A. J. y Wurtman R. J. (1996) Metabotropic glutamate receptors regulate APP processing in hippocampal neurons and cortical astrocytes derived from fetal rats. *Ann N Y Acad Sci* **777**, 338-343.
- Lee R. K., Wurtman R. J., Cox A. J. y Nitsch R. M. (1995) Amyloid precursor protein processing is stimulated by metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8083-8087.
- Lee Y. H., Kim S. Y., Kim J. R., Yoh K. T., Baek S. H., Kim M. J., Ryu S. H., Suh P. G. y Kim J. H. (2000b) Overexpression of phospholipase C β 2-1 protects NIH3T3 cells from oxidative stress-induced cell death. *Life Sci* **67**, 827-837.
- Leclercq V., Muller J. M. y Falcon J. (1998) Adenosine modulates cell proliferation in human colonic adenocarcinoma. I. Possible involvement of adenosine A1 receptor subtypes in HT29 cells. *Eur J Pharmacol* **341**, 289-297.
- León D., Albasanz J. L., Castillo C. A. y Martín M. (2008) Effect of glutamate intake during gestation on adenosine A(1) receptor/adenylyl cyclase pathway in both maternal and fetal rat brain. *J Neurochem* **104**, 435-445.
- León D., Albasanz J. L., Fernández M., Ruiz M. A. y Martín M. (2004) Down-regulation of rat brain adenosine A1 receptors at the end of pregnancy. *J Neurochem* **88**, 993-1002.
- León D., Albasanz J. L., Ruiz M. A. y Martín M. (2005) Chronic caffeine or theophylline intake during pregnancy inhibits A1 receptor function in the rat brain. *Neuroscience* **131**, 481-489.
- León D., Albasanz J. L., Ruiz M. A., Fernández M. y Martín M. (2002) Adenosine A1 receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *J Neurochem* **82**, 625-634.
- Li H. y Henry J. L. (1992) Adenosine-induced hyperpolarization is depressed by glibenclamide in rat CA1 neurones. *Neuroreport* **3**, 1113-1116.
- Li H. T., Honbo N. Y. y Karliner J. S. (1996) Chronic hypoxia increases beta 1-adrenergic receptor mRNA and density but not signaling in neonatal rat cardiac myocytes. *Circulation* **94**, 3303-3310.
- Li H. T., Long C. S., Rokosh D. G., Honbo N. Y. y Karliner J. S. (1995) Chronic hypoxia differentially regulates alpha 1-adrenergic receptor subtype mRNAs and inhibits alpha 1-adrenergic receptor-stimulated cardiac hypertrophy and signaling. *Circulation* **92**, 918-925.
- Lin J. H., Yang J., Liu S., Takano T., Wang X., Gao Q., Willecke K. y Nedergaard M. (2003) Connexin mediates gap junction-independent resistance to cellular injury. *J Neurosci* **23**, 430-441.
- Lin S. H. y Maiese K. (2001) The metabotropic glutamate receptor system protects against ischemic free radical programmed cell death in rat brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 262-275.

- Lipton S. A. y Rosenberg P. A. (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* **330**, 613-622.
- Liu M. y Kirchgessner A. L. (2000) Agonist- and reflex-evoked internalization of metabotropic glutamate receptor 5 in enteric neurons. *J Neurosci* **20**, 3200-3205.
- Lo E. H., Dalkara T. y Moskowitz M. A. (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* **4**, 399-415.
- Lobner D. (2002) Saturation of neuroprotective effects of adenosine in cortical culture. *Neuroreport* **13**, 2075-2078.
- Lohse M. J., Benovic J. L., Codina J., Caron M. G. y Lefkowitz R. J. (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**, 1547-1550.
- Lohse M. J., Klotz K. N., Lindenborn-Fotinos J., Reddington M., Schwabe U. y Olsson R. A. (1987) 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX)—a selective high affinity antagonist radioligand for A1 adenosine receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **336**, 204-210.
- Londos C., Cooper D. M. y Wolff J. (1980) Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 2551-2554.
- Lopes L. V., Cunha R. A. y Ribeiro J. A. (1999a) Increase in the number, G protein coupling, and efficiency of facilitatory adenosine A2A receptors in the limbic cortex, but not striatum, of aged rats. *J Neurochem* **73**, 1733-1738.
- Lopes L. V., Cunha R. A. y Ribeiro J. A. (1999b) Cross talk between A(1) and A(2A) adenosine receptors in the hippocampus and cortex of young adult and old rats. *J Neurophysiol* **82**, 3196-3203.
- Lopes L. V., Halldner L., Rebolá N., Johansson B., Ledent C., Chen J. F., Fredholm B. B. y Cunha R. A. (2004) Binding of the prototypical adenosine A(2A) receptor agonist CGS 21680 to the cerebral cortex of adenosine A(1) and A(2A) receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* **141**, 1006-1014.
- Lorenzen A., Sebastião A. M., Sellink A., Vogt H., Schwabe U., Ribeiro J. A. y AP I. J. (1997) Biological activities of N6,C8-disubstituted adenosine derivatives as partial agonists at rat brain adenosine A1 receptors. *Eur J Pharmacol* **334**, 299-307.
- Loumaye E. y Catt K. J. (1983) Agonist-induced regulation of pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone. Dissociation of receptor recruitment from hormone release in cultured gonadotrophs. *J Biol Chem* **258**, 12002-12009.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lucas D. R. y Newhouse J. P. (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* **58**, 193-201.
- Luján R., Shigemoto R. y López-Bendito G. (2005) Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* **130**, 567-580.
- M**
- Ma L., Ostrovsky H., Miles G., Lipski J., Funk G. D. y Nicholson L. F. (2006) Differential expression of group I metabotropic glutamate receptors in human motoneurons at low and high risk of degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* **143**, 95-104.
- Ma Q. L., Harris-White M. E., Ubeda O. J., Simmons M., Beech W., Lim G. P., Teter B., Frautschy S. A. y Cole G. M. (2007) Evidence of Abeta- and transgene-dependent defects in ERK-CREB signaling in Alzheimer's models. *J Neurochem* **103**, 1594-1607.
- MacGregor D. G., Graham D. I. y Stone T. W. (1997) The attenuation of kainate-induced neurotoxicity by chlormethiazole and its enhancement by dizocilpine, muscimol, and adenosine receptor agonists. *Exp Neurol* **148**, 110-123.
- MacGregor D. G., Miller W. J. y Stone T. W. (1993) Mediation of the neuroprotective action of R-phenylisopropyl-adenosine through a centrally located adenosine A1 receptor. *Br J Pharmacol* **110**, 470-476.
- Mackiewicz M., Nikonova E. V., Zimmermann J. E., Romer M. A., Cater J., Galante R. J. y Pack A. I. (2006) Age-related changes in adenosine metabolic enzymes in sleep/wake regulatory areas of the brain. *Neurobiol Aging* **27**, 351-360.
- Madden D. R. (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* **3**, 91-101.
- Maiese K., Swiriduk M. y TenBroeke M. (1996) Cellular mechanisms of protection by metabotropic glutamate receptors during anoxia and nitric oxide toxicity. *J Neurochem* **66**, 2419-2428.
- Maj M., Bruno V., Dragić Z., Yamamoto R., Battaglia G., Inderbitzin W., Stoehr N., Stein T., Gasparini F., Vranesic I., Kuhn R., Nicoletti F. y Flor P. J. (2003) (-)-PHCCC, a positive allosteric modulator of mGluR4: characterization, mechanism of action, and neuroprotection. *Neuropharmacology* **45**, 895-906.
- Makino Y., Kanopka A., Wilson W. J., Tanaka H. y Poellinger L. (2002) Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus. *J Biol Chem* **277**, 32405-32408.
- Malbon C. C., Rapijko P. J. y Mangano T. J. (1985) Fat cell adenylate cyclase system. Enhanced inhibition by adenosine and GTP in the hypothyroid rat. *J Biol Chem* **260**, 2558-2564.
- Mandelkow E. M., Schweers O., Drewes G., Biernat J., Gustke N., Trinczek B. y Mandelkow E. (1996) Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci* **777**, 96-106.
- Mantamadiotis T., Lemberger T., Bleckmann S. C., Kern H., Kretz O., Martin Villalba A., Tronche F., Kellendonk C., Gau D., Kapfhammer J., Otto C., Schmid W. y Schutz G. (2002) Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet* **31**, 47-54.
- Maragakis N. J., Rao M. S., Llado J., Wong V., Xue H., Pardo A., Herring J., Kerr D., Coccia C. y Rothstein J. D. (2005) Glial restricted precursors protect against chronic glutamate neurotoxicity of motor neurons in vitro. *Glia* **50**, 145-159.
- Marangolo M., McGee M. M., Tipton K. F., Williams D. C. y Zisterer D. M. (2001) Oxidative stress induces apoptosis in C6 glioma cells: involvement of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappa B. *Neurotox Res* **3**, 397-409.
- Marchese A., Paing M. M., Temple B. R. y Trejo J. (2008) G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**, 601-629.
- Martín E. D., Fernández M., Perea G., Pascual O., Haydon P. G., Araque A. y Cena V. (2007) Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *Glia* **55**, 36-45.
- Martínez-Velázquez M., Melendez-Zajgla J. y Maldonado V. (2007) Apoptosis induced by cAMP requires Smac/DIABLO transcriptional upregulation. *Cell Signal* **19**, 1212-1220.
- Martín-Ruiz C. M., Lee M., Perry R. H., Baumann M., Court J. A. y Perry E. K. (2004) Molecular analysis of nicotinic receptor expression in autism. *Brain Res Mol Brain Res* **123**, 81-90.
- Martiny-Baron G. y Fabbro D. (2007) Classical PKC isoforms in cancer. *Pharmacol Res* **55**, 477-486.
- Masliyah E., Raber J., Alford M., Mallory M., Mattson M. P., Yang D., Wong D. y Mucke L. (1998) Amyloid protein precursor stimulates excitatory amino acid transport. Implications for roles in neuroprotection and pathogenesis. *J Biol Chem* **273**, 12548-12554.
- Masu M., Iwakabe H., Tagawa Y., Miyoshi T., Yamashita M., Fukuda Y., Sasaki H., Hiroi K., Nakamura Y., Shigemoto R. y et al. (1995) Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* **80**, 757-765.

- Masu M., Tanabe Y., Tsuchida K., Shigemoto R. y Nakanishi S. (1991) Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* **349**, 760-765.
- Matos M., Augusto E., Oliveira C. R. y Agostinho P. (2008) Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. *Neuroscience* **156**, 898-910.
- Matrisciano F., Caruso A., Orlando R., Marchiafava M., Bruno V., Battaglia G., Gruber S. H., Melchiorri D., Tatarelli R., Girardi P., Mathè A. A. y Nicoletti F. (2008) Defective group-II metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of spontaneously depressed rats. *Neuropharmacology* **55**, 525-531.
- Mattson M. P. (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 120-129.
- Mattson M. P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**, 631-639.
- Mattson M. P. y Chan S. L. (2003) Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium* **34**, 385-397.
- Mattson M. P. y Kroemer G. (2003) Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med* **9**, 196-205.
- Mattson M. P. y Magnus T. (2006) Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* **7**, 278-294.
- Mattson M. P., Engle M. G. y Rychlik B. (1991) Effects of elevated intracellular calcium levels on the cytoskeleton and tau in cultured human cortical neurons. *Mol Chem Neuropathol* **15**, 117-142.
- Mayne M., Fotheringham J., Yan H. J., Power C., Del Bigio M. R., Peeling J. y Geiger J. D. (2001) Adenosine A2A receptor activation reduces proinflammatory events and decreases cell death following intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol* **49**, 727-735.
- Mayr B. y Montminy M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 599-609.
- McBean G. J. y Roberts P. J. (1985) Neurotoxicity of L-glutamate and DL-threo-3-hydroxyaspartate in the rat striatum. *J Neurochem* **44**, 247-254.
- McDowd J. M. y Craik F. I. (1988) Effects of aging and task difficulty on divided attention performance. *J Exp Psychol Hum Percept Perform* **14**, 267-280.
- McKenna M. C. (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res* **85**, 3347-3358.
- Melani A., De Micheli E., Pinna G., Alfieri A., Corte L. D. y Pedata F. (2003) Adenosine extracellular levels in human brain gliomas: an intraoperative microdialysis study. *Neurosci Lett* **346**, 93-96.
- Melchiorri D., Cappuccio I., Ciceroni C., Spinsanti P., Mosillo P., Sarichelou I., Sale P. y Nicoletti F. (2007) Metabotropic glutamate receptors in stem/progenitor cells. *Neuropharmacology* **53**, 473-480.
- Meli E., Baronti R., Pangallo M., Picca R., Moroni F. y Pellegrini-Giampietro D. E. (2005) Group I metabotropic glutamate receptors stimulate the activity of poly(ADP-ribose) polymerase in mammalian mGlu1-transfected cells and in cortical cell cultures. *Neuropharmacology* **49 Suppl 1**, 80-88.
- Merighi S., Mirandola P., Milani D., Varani K., Gessi S., Klotz K. N., Leung E., Baraldi P. G. y Borea P. A. (2002) Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *J Invest Dermatol* **119**, 923-933.
- Merighi S., Mirandola P., Varani K., Gessi S., Leung E., Baraldi P. G., Tabrizi M. A. y Borea P. A. (2003) A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol Ther* **100**, 31-48.
- Meyer P. T., Elmenhorst D., Boy C., Winz O., Matusch A., Zilles K. y Bauer A. (2007) Effect of aging on cerebral A1 adenosine receptors: A [18F]CPFPX PET study in humans. *Neurobiol Aging* **28**, 1914-1924.
- Michaelis E. K. (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* **54**, 369-415.
- Milligan G. (2006) G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery. *Drug Discov Today* **11**, 541-549.
- Milligan G. (2008) A day in the life of a G protein-coupled receptor: the contribution to function of G protein-coupled receptor dimerization. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**, S216-229.
- Milligan G. y Kostenis E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**, S46-55.
- Mion S., Corti C., Neki A., Shigemoto R., Corsi M., Fumagalli G. y Ferraguti F. (2001) Bidirectional regulation of neurite elaboration by alternatively spliced metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) isoforms. *Mol Cell Neurosci* **17**, 957-972.
- Mizukami Y., Kobayashi S., Uberall F., Hellbert K., Kobayashi N. y Yoshida K. (2000) Nuclear mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase c ζ during reoxygenation after ischemic hypoxia. *J Biol Chem* **275**, 19921-19927.
- Moldrich R. X., Giardina S. F. y Beart P. M. (2001) Group II mGlu receptor agonists fail to protect against various neurotoxic insults induced in murine cortical, striatal and cerebellar granular pure neuronal cultures. *Neuropharmacology* **41**, 19-31.
- Monopoli A., Lozza G., Forlani A., Mattavelli A. y Ongini E. (1998) Blockade of adenosine A2A receptors by SCH 58261 results in neuroprotective effects in cerebral ischaemia in rats. *Neuroreport* **9**, 3955-3959.
- Mons N. y Cooper D. M. (1995) Adenylate cyclases: critical foci in neuronal signaling. *Trends Neurosci* **18**, 536-542.
- Morato E. y Mayor F., Jr. (1993) Production of the Alzheimer's beta-amyloid peptide by C6 glioma cells. *FEBS Lett* **336**, 275-278.
- Morley J. E. (2002) The SAMP8 mouse: a model of Alzheimer disease? *Biogerontology* **3**, 57-60.
- Morley J. E., Kumar V. B., Bernardo A. E., Farr S. A., Uezu K., Tumosa N. y Flood J. F. (2000) Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides* **21**, 1761-1767.
- Muir K. W. (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 53-60.
- Muir K. W. y Lees K. R. (1995) Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* **26**, 503-513.
- Muller F. L., Lustgarten M. S., Jang Y., Richardson A. y Van Remmen H. (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* **43**, 477-503.
- Mundell S. J., Matharu A. L., Pula G., Roberts P. J. y Kelly E. (2001) Agonist-induced internalization of the metabotropic glutamate receptor 1a is arrestin- and dynamin-dependent. *J Neurochem* **78**, 546-551.
- Murillo-Rodriguez E., Blanco-Centurion C., Gerashchenko D., Salin-Pascual R. J. y Shiromani P. J. (2004) The diurnal rhythm of adenosine levels in the basal forebrain of young and old rats. *Neuroscience* **123**, 361-370.
- Murphy M. G., Moak C. M., Byczko Z. y MacDonald W. F. (1991) Adenosine-dependent regulation of cyclic AMP accumulation in primary cultures of rat astrocytes and neurons. *J Neurosci Res* **30**, 631-640.
- Musante V., Neri E., Feligioni M., Puliti A., Pedrazzi M., Conti V., Usai C., Diaspro A., Ravazzolo R., Henley J. M., Battaglia G. y Pittaluga A. (2008) Presynaptic mGlu1 and mGlu5 autoreceptors facilitate glutamate exocytosis from mouse cortical nerve endings. *Neuropharmacology* **55**, 474-482.

N

- Naassila M., Ledent C. y Daoust M. (2002) Low ethanol sensitivity and increased ethanol consumption in mice lacking adenosine A2A receptors. *J Neurosci* **22**, 10487-10493.
- Nagasawa H., Araki T. y Kogure K. (1994) Alteration of adenosine A1 receptor binding in the post-ischaemic rat brain. *Neuroreport* **5**, 1453-1456.
- Nagasawa K., Aoki H., Yasuda E., Nagai K., Shimohama S. y Fujimoto S. (2004) Possible involvement of group I mGluRs in neuroprotective effect of theanine. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 116-122.
- Nakamichi N., Kambe Y., Oikawa H., Ogura M., Takano K., Tamaki K., Inoue M., Hinoi E. y Yoneda Y. (2005) Protection by exogenous pyruvate through a mechanism related to monocarboxylate transporters against cell death induced by hydrogen peroxide in cultured rat cortical neurons. *J Neurochem* **93**, 84-93.
- Nelson C. P. y Challiss R. A. (2007) "Phenotypic" pharmacology: the influence of cellular environment on G protein-coupled receptor antagonist and inverse agonist pharmacology. *Biochem Pharmacol* **73**, 737-751.
- Newby A. C. (1991) Adenosine: origin and clinical roles. *Adv Exp Med Biol* **309A**, 265-270.
- Nicolas F., Oillet J., Koziel V. y Daval J. L. (1994) Characterization of adenosine receptors in a model of cultured neurons from rat forebrain. *Neurochem Res* **19**, 507-515.
- Nicoletti F., Arcella A., Iacovelli L., Battaglia G., Giangaspero F. y Melchiorri D. (2007) Metabotropic glutamate receptors: new targets for the control of tumor growth? *Trends Pharmacol Sci* **28**, 206-213.
- Nicoletti F., Collingridge G. y Schoepp D. (2008) 2008 Eruptions in metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* **55**, 391.
- Nicoletti V. G. y Stella A. M. (2003) Role of PARP under stress conditions: cell death or protection? *Neurochem Res* **28**, 187-194.
- Nielsen H. M., Veerhuis R., Holmqvist B. y Janciauskiene S. (2008) Binding and uptake of Abeta1-42 by primary human astrocytes in vitro. *Glia*.
- Nishi A., Liu F., Matsuyama S., Hamada M., Higashi H., Nairn A. C. y Greengard P. (2003) Metabotropic mGlu5 receptors regulate adenosine A2A receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1322-1327.
- Nishizaki T., Nagai K., Nomura T., Tada H., Kanno T., Tozaki H., Li X. X., Kondoh T., Kodama N., Takahashi E., Sakai N., Tanaka K. y Saito N. (2002) A new neuromodulatory pathway with a glial contribution mediated via A(2a) adenosine receptors. *Glia* **39**, 133-147.
- Nomura Y. y Okuma Y. (1999) Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* **20**, 111-115.
- Nordstedt C. y Fredholm B. B. (1990) A modification of a protein-binding method for rapid quantification of cAMP in cell-culture supernatants and body fluid. *Anal Biochem* **189**, 231-234.
- Nunomura A., Perry G., Aliev G., Hirai K., Takeda A., Balraj E. K., Jones P. K., Ghanbari H., Wataya T., Shimohama S., Chiba S., Atwood C. S., Petersen R. B. y Smith M. A. (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 759-767.

O

- Ohana G., Bar-Yehuda S., Barer F. y Fishman P. (2001) Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: focus on the A3 adenosine receptor. *J Cell Physiol* **186**, 19-23.

- Ohta R. J., Walsh D. A. y Krauss I. K. (1981) Spatial perspective-taking ability in young and elderly adults. *Exp Aging Res* **7**, 45-63.
- Okada D. (1992) Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. *J Neurochem* **59**, 1203-1210.
- Olanow C. W. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci* **16**, 439-444.
- Olney J. W. (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**, 719-721.
- Olney J. W. (1990) Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**, 47-71.
- Olney J. W., Ho O. L., Rhee V. y DeGubareff T. (1973) Letter: Neurotoxic effects of glutamate. *N Engl J Med* **289**, 1374-1375.
- O'Malley K. L., Jong Y. J., Gonchar Y., Burkhaltner A. y Romano C. (2003) Activation of metabotropic glutamate receptor mGlu5 on nuclear membranes mediates intranuclear Ca2+ changes in heterologous cell types and neurons. *J Biol Chem* **278**, 28210-28219.
- Onodera H., Sato G. y Kogure K. (1987) Quantitative autoradiographic analysis of muscarinic cholinergic and adenosine A1 binding sites after transient forebrain ischemia in the gerbil. *Brain Res* **415**, 309-322.
- Ozes O. N., Mayo L. D., Gustin J. A., Pfeffer S. R., Pfeffer L. M. y Donner D. B. (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**, 82-85.

P

- Pacheco Otalora L. F., Couoh J., Shigamoto R., Zarei M. M. y Garrido Sanabria E. R. (2006) Abnormal mGluR2/3 expression in the perforant path termination zones and mossy fibers of chronically epileptic rats. *Brain Res* **1098**, 170-185.
- Pagonopoulou O. y Angelatou F. (1992) Reduction of A1 adenosine receptors in cortex, hippocampus and cerebellum in ageing mouse brain. *Neuroreport* **3**, 735-737.
- Pak Y., O'Dowd B. F., Wang J. B. y George S. R. (1999) Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **274**, 27610-27616.
- Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox B. A., Le Trong I., Teller D. C., Okada T., Stenkamp R. E., Yamamoto M. y Miyano M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745.
- Pallàs M., Camins A., Smith M. A., Perry G., Lee H. G. y Casadesus G. (2008) From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis* **15**, 615-624.
- Palmer T. M. y Stiles G. L. (1999) Stimulation of A(2A) adenosine receptor phosphorylation by protein kinase C activation: evidence for regulation by multiple protein kinase C isoforms. *Biochemistry* **38**, 14833-14842.
- Palmer T. M., Poucher S. M., Jacobson K. A. y Stiles G. L. (1995) 125I-4-(2-[7-amino-2-[2-furyl][1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-yl-amino]ethyl)phenol, a high affinity antagonist radioligand selective for the A2a adenosine receptor. *Mol Pharmacol* **48**, 970-974.
- Paratcha G. y Ledda F. (2008) GDNF and GFRalpha: a versatile molecular complex for developing neurons. *Trends Neurosci* **31**, 384-391.
- Parker K. K., Norenberg M. D. y Vernadakis A. (1980) "Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. *Science* **208**, 179-181.

- Parkinson F. E., Ferguson J., Zamzow C. R. y Xiong W. (2006) Gene expression for enzymes and transporters involved in regulating adenosine and inosine levels in rat forebrain neurons, astrocytes and C6 glioma cells. *J Neurosci Res* **84**, 801-808.
- Paterlini M., Valerio A., Baruzzi F., Memo M. y Spano P. F. (1998) Opposing regulation of tau protein levels by ionotropic and metabotropic glutamate receptors in human NT2 neurons. *Neurosci Lett* **243**, 77-80.
- Peachey J. A., Hourani S. M. y Kitchen I. (1994) The binding of 1,3-[3H]-dipropyl-8-cyclopentylxanthine to adenosine A1 receptors in rat smooth muscle preparations. *Br J Pharmacol* **113**, 1249-1256.
- Peakman M. C. y Hill S. J. (1994) Adenosine A2B-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. *Br J Pharmacol* **111**, 191-198.
- Pearson T., Damian K., Lynas R. E. y Frenguelli B. G. (2006) Sustained elevation of extracellular adenosine and activation of A1 receptors underlie the post-ischaemic inhibition of neuronal function in rat hippocampus in vitro. *J Neurochem* **97**, 1357-1368.
- Peavy R. D., Chang M. S., Sanders-Bush E. y Conn P. J. (2001) Metabotropic glutamate receptor 5-induced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in astrocytes depends on transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Neurosci* **21**, 9619-9628.
- Pedersen W. A., Fu W., Keller J. N., Markesbery W. R., Appel S., Smith R. G., Kasarskis E. y Mattson M. P. (1998) Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Neurol* **44**, 819-824.
- Pekhletski R., Gerlai R., Overstreet L. S., Huang X. P., Agopyan N., Slater N. T., Abramow-Newerly W., Roder J. C. y Hampson D. R. (1996) Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J Neurosci* **16**, 6364-6373.
- Pelkey K. A., Yuan X., Lavezzari G., Roche K. W. y McBain C. J. (2007) mGluR7 undergoes rapid internalization in response to activation by the allosteric agonist AMN082. *Neuropharmacology* **52**, 108-117.
- Peltier J., O'Neill A. y Schaffer D. V. (2007) PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Dev Neurobiol* **67**, 1348-1361.
- Penela P., Ribas C. y Mayor F., Jr. (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* **15**, 973-981.
- Perez-Buira S., Barrachina M., Rodríguez A., Albasanz J. L., Martín M. y Ferrer I. (2007) Expression levels of adenosine receptors in hippocampus and frontal cortex in argyrophilic grain disease. *Neurosci Lett* **423**, 194-199.
- Pérez-Capote K., Serratos J. y Sola C. (2004) Glial activation modulates glutamate neurotoxicity in cerebellar granule cell cultures. *Glia* **45**, 258-268.
- Phillis J. W., Walter G. A. y Simpson R. E. (1991) Brain adenosine and transmitter amino acid release from the ischemic rat cerebral cortex: effects of the adenosine deaminase inhibitor deoxycytosine. *J Neurochem* **56**, 644-650.
- Phillis J. W., Walter G. A., O'Regan M. H. y Stair R. E. (1987) Increases in cerebral cortical perfusate adenosine and inosine concentrations during hypoxia and ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **7**, 679-686.
- Pianet I., Merle M. y Labouesse J. (1989) ADP and, indirectly, ATP are potent inhibitors of cAMP production in intact isoproterenol-stimulated C6 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **163**, 1150-1157.
- Pierce K. L. y Lefkowitz R. J. (2001) Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**, 727-733.
- Pike C. J., Burdick D., Walencewicz A. J., Glabe C. G. y Cotman C. W. (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* **13**, 1676-1687.
- Pin J. P. y Duvoisin R. (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* **34**, 1-26.
- Pin J. P., Galvez T. y Prézeau L. (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **98**, 325-354.
- Pinheiro P. S. y Mulle C. (2008) Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci* **9**, 423-436.
- Pinna A., Corsi C., Carta A. R., Valentini V., Pedata F. y Morelli M. (2002) Modification of adenosine extracellular levels and adenosine A(2A) receptor mRNA by dopamine denervation. *Eur J Pharmacol* **446**, 75-82.
- Pintor A., Galluzzo M., Grieco R., Pezzola A., Reggio R. y Popoli P. (2004) Adenosine A2A receptor antagonists prevent the increase in striatal glutamate levels induced by glutamate uptake inhibitors. *J Neurochem* **89**, 152-156.
- Pisani A., Gubellini P., Bonsi P., Conquet F., Picconi B., Centonze D., Bernardi G. y Calabresi P. (2001) Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons. *Neuroscience* **106**, 579-587.
- Pitcher J., Lohse M. J., Codina J., Caron M. G. y Lefkowitz R. J. (1992) Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochemistry* **31**, 3193-3197.
- Pizzi M., Sarnico I., Boroni F., Benarese M., Steimberg N., Mazzoleni G., Dietz G. P., Bahr M., Liou H. C. y Spano P. F. (2005) NF-kappaB factor c-Rel mediates neuroprotection elicited by mGlu5 receptor agonists against amyloid beta-peptide toxicity. *Cell Death Differ* **12**, 761-772.
- Poli A., Beraudi A., Villani L., Storto M., Battaglia G., Di Giorgi Gerevini V., Cappuccio I., Caricasole A., D'Onofrio M. y Nicoletti F. (2003) Group II metabotropic glutamate receptors regulate the vulnerability to hypoxic brain damage. *J Neurosci* **23**, 6023-6029.
- Popoli P., Pintor A., Domenici M. R., Frank C., Tebano M. T., Pèzzola A., Scarchilli L., Quarta D., Reggio R., Malchiodi-Albedi F., Falchi M. y Massotti M. (2002) Blockade of striatal adenosine A2A receptor reduces, through a presynaptic mechanism, quinolinic acid-induced excitotoxicity: possible relevance to neuroprotective interventions in neurodegenerative diseases of the striatum. *J Neurosci* **22**, 1967-1975.
- Pouyssegur J., Dayan F. y Mazure N. M. (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**, 437-443.
- Prezeau L., Carrette J., Hulpap B., Curry K., Pin J. P. y Bockaert J. (1994) Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors in several types of brain cells in primary cultures. *Mol Pharmacol* **45**, 570-577.
- Procter A. W., Palmer A. M., Francis P. T., Lowe S. L., Neary D., Murphy E., Doshi R. y Bowen D. M. (1988) Evidence of glutamatergic denervation and possible abnormal metabolism in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **50**, 790-802.
- Pshenichkin S., Dolinska M., Klauzinska M., Luchenko V., Grajkowska E. y Wroblewski J. T. (2008) Dual neurotoxic and neuroprotective role of metabotropic glutamate receptor 1 in conditions of trophic deprivation - possible role as a dependence receptor. *Neuropharmacology* **55**, 500-508.

- Puttonen K. A., Lehtonen S., Lampela P., Mannisto P. T. y Raasmaja A. (2008) Different viabilities and toxicity types after 6-OHDA and Ara-C exposure evaluated by four assays in five cell lines. *Toxicol In Vitro* **22**, 182-189.
- Q**
- Querfurth H. W., Jiang J., Geiger J. D. y Selkoe D. J. (1997) Caffeine stimulates amyloid beta-peptide release from beta-amyloid precursor protein-transfected HEK293 cells. *J Neurochem* **69**, 1580-1591.
- Quintero M., Mackenzie N. y Brennan P. A. (2004) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *Eur J Surg Oncol* **30**, 465-468.
- R**
- Ramírez J. L., Watt H. L., Rocheville M. y Kumar U. (2005) Agonist-induced up-regulation of human somatostatin receptor type 1 is regulated by beta-arrestin-1 and requires an essential serine residue in the receptor C-tail. *Biochim Biophys Acta* **1669**, 182-192.
- Rebola N., Porciuncula L. O., Lopes L. V., Oliveira C. R., Soares-da-Silva P. y Cunha R. A. (2005a) Long-term effect of convulsive behavior on the density of adenosine A1 and A2A receptors in the rat cerebral cortex. *Epilepsia* **46 Suppl 5**, 159-165.
- Rebola N., Rodrigues R. J., Lopes L. V., Richardson P. J., Oliveira C. R. y Cunha R. A. (2005b) Adenosine A1 and A2A receptors are co-expressed in pyramidal neurons and colocalized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus. *Neuroscience* **133**, 79-83.
- Ren A., Yan X., Lu H., Shi J., Yin Y., Bai J., Yuan W. y Lin L. (2008) Antagonism of endothelin-1 inhibits hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Can J Physiol Pharmacol* **86**, 536-540.
- Ren M., Yoshimura Y., Takada N., Horibe S. y Komatsu Y. (2007) Specialized inhibitory synaptic actions between nearby neocortical pyramidal neurons. *Science* **316**, 758-761.
- Reppert S. M., Weaver D. R., Stehle J. H. y Rivkees S. A. (1991) Molecular cloning and characterization of a rat A1-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Mol Endocrinol* **5**, 1037-1048.
- Ribeiro J. A. (1979) Purinergic modulation of transmitter release. *J Theor Biol* **80**, 259-270.
- Ribeiro J. A., Sebastião A. M. y de Mendonça A. (2002) Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol* **68**, 377-392.
- Rodrigues R. J., Canas P. M., Lopes L. V., Oliveira C. R. y Cunha R. A. (2008) Modification of adenosine modulation of acetylcholine release in the hippocampus of aged rats. *Neurobiol Aging* **29**, 1597-1601.
- Rodríguez A. y Ferrer I. (2007) Expression of transcription factors CREB and c-Fos in the brains of terminal Creutzfeldt-Jakob disease cases. *Neurosci Lett* **421**, 10-15.
- Rodríguez A., Martín M., Albasanz J. L., Barrachina M., Espinosa J. C., Torres J. M. y Ferrer I. (2006) Group I mGluR signaling in BSE-infected bovine-PrP transgenic mice. *Neurosci Lett* **410**, 115-120.
- Romano C., Yang W. L. y O'Malley K. L. (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* **271**, 28612-28616.
- Rossi D. J., Oshima T. y Attwell D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* **403**, 316-321.
- Ruiz A., Sanz J. M., González-Calero G., Fernandez M., Andrés A., Cubero A. y Ros M. (1996) Desensitization and internalization of adenosine A1 receptors in rat brain by in vivo treatment with R-PIA: involvement of coated vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1310**, 168-174.
- Ruiz M. A., Albasanz J. L., León D., Ros M., Andrés A. y Martín M. (2005) Different modulation of inhibitory and stimulatory pathways mediated by adenosine after chronic in vivo agonist exposure. *Brain Res* **1031**, 211-221.
- Ruiz M. A., Escriche M., Lluís C., Franco R., Martín M., Andrés A. y Ros M. (2000) Adenosine A(1) receptor in cultured neurons from rat cerebral cortex: colocalization with adenosine deaminase. *J Neurochem* **75**, 656-664.
- Ryan H. E., Lo J. y Johnson R. S. (1998) HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* **17**, 3005-3015.
- Ryzhov S., McCaleb J. L., Goldstein A. E., Biaggioni I. y Feoktistov I. (2007) Role of adenosine receptors in the regulation of angiogenic factors and neovascularization in hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther* **320**, 565-572.
- S**
- Sabelhaus C. F., Schroder U. H., Breder J., Henrich-Noack P. y Reymann K. G. (2000) Neuroprotection against hypoxic/hypoglycaemic injury after the insult by the group III metabotropic glutamate receptor agonist (R, S)-4-phosphonophenylglycine. *Br J Pharmacol* **131**, 655-658.
- Sagara Y. y Schubert D. (1998) The activation of metabotropic glutamate receptors protects nerve cells from oxidative stress. *J Neurosci* **18**, 6662-6671.
- Sands W. A., Martin A. F., Strong E. W. y Palmer T. M. (2004) Specific inhibition of nuclear factor-kappaB-dependent inflammatory responses by cell type-specific mechanisms upon A2A adenosine receptor gene transfer. *Mol Pharmacol* **66**, 1147-1159.
- Sansig G., Bushell T. J., Clarke V. R., Rozov A., Burnashev N., Portet C., Gasparini F., Schmutz M., Klebs K., Shigemoto R., Flor P. J., Kuhn R., Knoepfel T., Schroeder M., Hampson D. R., Collett V. J., Zhang C., Duvoisin R. M., Collingridge G. L. y van Der Putten H. (2001) Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *J Neurosci* **21**, 8734-8745.
- Santore M. T., McClintock D. S., Lee V. Y., Budinger G. R. y Chandel N. S. (2002) Anoxia-induced apoptosis occurs through a mitochondria-dependent pathway in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**, L727-734.
- Sanz J. M., Vendite D., Fernández M., Andrés A. y Ros M. (1996) Adenosine A1 receptors in cultured cerebellar granule cells: role of endogenous adenosine. *J Neurochem* **67**, 1469-1477.
- Saransaari P. y Oja S. S. (2004) Characteristics of taurine release induced by free radicals in mouse hippocampal slices. *Amino Acids* **26**, 91-98.
- Saransaari P. y Oja S. S. (2008) Characteristics of GABA release induced by free radicals in mouse hippocampal slices. *Neurochem Res* **33**, 384-393.
- Sarkar S. N., Huang R. Q., Logan S. M., Yi K. D., Dillon G. H. y Simpkins J. W. (2008) Estrogens directly potentiate neuronal L-type Ca2+ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15148-15153.
- Satoh T., Sakai N., Enokido Y., Uchiyama Y. y Hatanaka H. (1996) Survival factor-insensitive generation of reactive oxygen species induced by serum deprivation in neuronal cells. *Brain Res* **733**, 9-14.
- Sattin A. y Rall T. W. (1970) The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3', 5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. *Mol Pharmacol* **6**, 13-23.
- Saura J., Angulo E., Ejarque A., Casado V., Tusell J. M., Moratalla R., Chen J. F., Schwarzschild M. A., Lluís C., Franco R. y Serratosa J. (2005) Adenosine A2A receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. *J Neurochem* **95**, 919-929.

- Scartabelli T., Gerace E., Landucci E., Moroni F. y Pellegrini-Giampietro D. E. (2008) Neuroprotection by group I mGlu receptors in a rat hippocampal slice model of cerebral ischemia is associated with the PI3K-Akt signaling pathway: a novel postconditioning strategy? *Neuropharmacology* **55**, 509-516.
- Schaeffer V., Meyer L., Patte-Mensah C., Eckert A. y Mensah-Nyagan A. G. (2008) Dose-dependent and sequence-sensitive effects of amyloid-beta peptide on neurosteroidogenesis in human neuroblastoma cells. *Neurochem Int* **52**, 948-955.
- Schmaltz C., Hardenbergh P. H., Wells A. y Fisher D. E. (1998) Regulation of proliferation-survival decisions during tumor cell hypoxia. *Mol Cell Biol* **18**, 2845-2854.
- Schmittgen T. D. y Livak K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**, 1101-1108.
- Schoepp D. D. (2001) Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 12-20.
- Schröder U. H., Opitz T., Jäger T., Sabelhaus C. F., Breder J. y Reymann K. G. (1999) Protective effect of group I metabotropic glutamate receptor activation against hypoxic/hypoglycemic injury in rat hippocampal slices: timing and involvement of protein kinase C. *Neuropharmacology* **38**, 209-216.
- Schubert P., Ogata T., Ferroni S., McRae A., Nakamura Y. y Rudolph K. (1996) Modulation of glial cell signaling by adenosine and pharmacological reinforcement. A neuroprotective strategy? *Mol Chem Neuropathol* **28**, 185-190.
- Schubert P., Ogata T., Marchini C. y Ferroni S. (2001) Glia-related pathomechanisms in Alzheimer's disease: a therapeutic target? *Mech Ageing Dev* **123**, 47-57.
- Schulte G. y Fredholm B. B. (2000) Human adenosine A(1), A(2A), A(2B), and A(3) receptors expressed in Chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2. *Mol Pharmacol* **58**, 477-482.
- Schwaninger M., Neher M., Viegas E., Schneider A. y Spranger M. (1997) Stimulation of interleukin-6 secretion and gene transcription in primary astrocytes by adenosine. *J Neurochem* **69**, 1145-1150.
- Schweichel J. U. y Merker H. J. (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* **7**, 253-266.
- Scott H. L., Pow D. V., Tannenberg A. E. y Dodd P. R. (2002) Aberrant expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **22**, RC206.
- Sebastião A. M., Cunha R. A., de Mendonça A. y Ribeiro J. A. (2000) Modification of adenosine modulation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *Br J Pharmacol* **131**, 1629-1634.
- Sebastião A. M., de Mendonça A. y Ribeiro J. A. (2001) Neuroprotection during hypoxic insults: Role of adenosine. *Drug Develop Res* **52**, 291-295.
- Selkoe D. J. (2004) Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol* **6**, 1054-1061.
- Selley M. L. (2004) Increased homocysteine and decreased adenosine formation in Alzheimer's disease. *Neurol Res* **26**, 554-557.
- Semenza G. L. (2001) HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* **107**, 1-3.
- Sextl V., Mancusi G., Holler C., Gloria-Maercker E., Schutz W. y Freissmuth M. (1997) Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A2A-adenosine receptor in primary human endothelial cells. *J Biol Chem* **272**, 5792-5799.
- Shankar G. M., Li S., Mehta T. H., Garcia-Munoz A., Shepardson N. E., Smith I., Brett F. M., Farrell M. A., Rowan M. J., Lemere C. A., Regan C. M., Walsh D. M., Sabatini B. L. y Selkoe D. J. (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* **14**, 837-842.
- Sharon D., Vorobiov D. y Dascal N. (1997) Positive and negative coupling of the metabotropic glutamate receptors to a G protein-activated K⁺ channel, GIRK, in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* **109**, 477-490.
- Sheldon A. L. y Robinson M. B. (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int* **51**, 333-355.
- Shenoy S. K. y Lefkowitz R. J. (2005) Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin. *Sci STKE* **2005**, cm10.
- Shigemoto R., Kinoshita A., Wada E., Nomura S., Ohishi H., Takada M., Flor P. J., Neki A., Abe T., Nakanishi S. y Mizuno N. (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* **17**, 7503-7522.
- Shigeri Y., Seal R. P. y Shimamoto K. (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* **45**, 250-265.
- Shin S. S., Martino J. J. y Chen S. (2008) Metabotropic glutamate receptors (mGlu) and cellular transformation. *Neuropharmacology* **55**, 396-402.
- Shoji M., Golde T. E., Ghiso J., Cheung T. T., Estus S., Shaffer L. M., Cai X. D., McKay D. M., Tintner R., Frangione B. y et al. (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* **258**, 126-129.
- Skeberdis V. A., Lan J., Opitz T., Zheng X., Bennett M. V. y Zukin R. S. (2001) mGluR1-mediated potentiation of NMDA receptors involves a rise in intracellular calcium and activation of protein kinase C. *Neuropharmacology* **40**, 856-865.
- Skerry T. M. y Genever P. G. (2001) Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 174-181.
- Sladeczek F., Pin J. P., Recasens M., Bockaert J. y Weiss S. (1985) Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* **317**, 717-719.
- Small S. A. y Duff K. (2008) Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* **60**, 534-542.
- Smith A. D., Cheek D. J., Buxton I. L. y Westfall D. P. (1997) Competition of adenine nucleotides for a 1,3-[3H]-dipropyl-8-cyclopentylxanthine binding site in rat vas deferens. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**, 492-497.
- Sorensen S. D. y Conn P. J. (2003) G protein-coupled receptor kinases regulate metabotropic glutamate receptor 5 function and expression. *Neuropharmacology* **44**, 699-706.
- Sperlágh B., Zsilla G., Baranyi M., Kékes-Szabó A. y Vizi E. S. (1997) Age-dependent changes of presynaptic neuromodulation via A1-adenosine receptors in rat hippocampal slices. *Int J Dev Neurosci* **15**, 739-747.
- Spielman W. S., Klotz K. N., Arend L. J., Olson B. A., LeVier D. G. y Schwabe U. (1992) Characterization of adenosine A1 receptor in a cell line (28A) derived from rabbit collecting tubule. *Am J Physiol* **263**, C502-508.
- Spillson A. B. y Russell J. W. (2003) Metabotropic glutamate receptor regulation of neuronal cell death. *Exp Neurol* **184 Suppl 1**, S97-105.
- Sribnick E. A., Ray S. K. y Banik N. L. (2006) Estrogen prevents glutamate-induced apoptosis in C6 glioma cells by a receptor-mediated mechanism. *Neuroscience* **137**, 197-209.
- Stone T. W. (2002) Purines and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol* **513**, 249-280.
- Stone T. W. (2005) Adenosine, neurodegeneration and neuroprotection. *Neurol Res* **27**, 161-168.

- Sur P., Sribnick E. A., Wingrave J. M., Nowak M. W., Ray S. K. y Banik N. L. (2003) Estrogen attenuates oxidative stress-induced apoptosis in C6 glial cells. *Brain Res* **971**, 178-188.
- Svenningsson P., Hall H., Sedvall G. y Fredholm B. B. (1997) Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. *Synapse* **27**, 322-335.
- ## T
- Takadera T., Sakura N., Mohri T. y Hashimoto T. (1993) Toxic effect of a beta-amyloid peptide (beta 22-35) on the hippocampal neuron and its prevention. *Neurosci Lett* **161**, 41-44.
- Takahashi M. y Alford S. (2002) The requirement of presynaptic metabotropic glutamate receptors for the maintenance of locomotion. *J Neurosci* **22**, 3692-3699.
- Takeda T. (2009) Senescence-Accelerated Mouse (SAM) with Special References to Neurodegeneration Models, SAMP8 and SAMP10 Mice. *Neurochem Res*.
- Takeda T., Hosokawa M., Takeshita S., Irino M., Higuchi K., Matsushita T., Tomita Y., Yasuhira K., Hamamoto H., Shimizu K., Ishii M. y Yamamuro T. (1981) A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* **17**, 183-194.
- Tamaru Y., Nomura S., Mizuno N. y Shigemoto R. (2001) Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience* **106**, 481-503.
- Tan S., Sagara Y., Liu Y., Maher P. y Schubert D. (1998) The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* **141**, 1423-1432.
- Tanabe Y., Nomura A., Masu M., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S. (1993) Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J Neurosci* **13**, 1372-1378.
- Taylor D. L., Diemel L. T. y Pocock J. M. (2003) Activation of microglial group III metabotropic glutamate receptors protects neurons against microglial neurotoxicity. *J Neurosci* **23**, 2150-2160.
- Terrillon S. y Bouvier M. (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* **5**, 30-34.
- The state of GPCR research in 2004 (2004) The state of GPCR research in 2004. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 575, 577-626.
- Thomas R. F., Holt B. D., Schwinn D. A. y Liggett S. B. (1992) Long-term agonist exposure induces upregulation of beta 3-adrenergic receptor expression via multiple cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4490-4494.
- Thomas U. (2002) Modulation of synaptic signalling complexes by Homer proteins. *J Neurochem* **81**, 407-413.
- Thompson S. M., Haas H. L. y Gahwiler B. H. (1992) Comparison of the actions of adenosine at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol* **451**, 347-363.
- Thorn P., Lawrie A. M., Smith P. M., Gallacher D. V. y Petersen O. H. (1993) Local and global cytosolic Ca²⁺ oscillations in exocrine cells evoked by agonists and inositol trisphosphate. *Cell* **74**, 661-668.
- Tilley S. L., Wagoner V. A., Salvatore C. A., Jacobson M. A. y Koller B. H. (2000) Adenosine and inosine increase cutaneous vasopermeability by activating A(3) receptors on mast cells. *J Clin Invest* **105**, 361-367.
- Tobin A. B., Butcher A. J. y Kong K. C. (2008) Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 413-420.
- Trejo J. (2005) Internal PDZ ligands: novel endocytic recycling motifs for G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **67**, 1388-1390.
- Trincavelli M. L., Marroni M., Tuscano D., Ceruti S., Mazzola A., Mitro N., Abbraccio M. P. y Martini C. (2004) Regulation of A2B adenosine receptor functioning by tumour necrosis factor α in human astroglial cells. *J Neurochem* **91**, 1180-1190.
- Trombley P. Q. y Westbrook G. L. (1992) L-AP4 inhibits calcium currents and synaptic transmission via a G-protein-coupled glutamate receptor. *J Neurosci* **12**, 2043-2050.
- Tsao P., Cao T. y von Zastrow M. (2001) Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 91-96.
- Tsutsui S., Schnermann J., Noorbakhsh F., Henry S., Yong V. W., Winston B. W., Warren K. y Power C. (2004) A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. *J Neurosci* **24**, 1521-1529.
- Turner C. P., Blackburn M. R. y Rivkees S. A. (2004) A1 adenosine receptors mediate hypoglycemia-induced neuronal injury. *J Mol Endocrinol* **32**, 129-144.
- Tyner S. D., Venkatachalam S., Choi J., Jones S., Ghebranos N., Igelmann H., Lu X., Soron G., Cooper B., Brayton C., Hee Park S., Thompson T., Karsenty G., Bradley A. y Donehower L. A. (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415**, 45-53.
- ## U
- Ueda K., Yagami T., Asakura K. y Kawasaki K. (1997) Chlorpromazine reduces toxicity and Ca²⁺ uptake induced by amyloid beta protein (25-35) in vitro. *Brain Res* **748**, 184-188.
- Ulas J., Brunner L. C., Nguyen L. y Cotman C. W. (1993) Reduced density of adenosine A1 receptors and preserved coupling of adenosine A1 receptors to G proteins in Alzheimer hippocampus: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* **52**, 843-854.
- Ulus I. H. y Wurtman R. J. (1997) Metabotropic glutamate receptor agonists increase release of soluble amyloid precursor protein derivatives from rat brain cortical and hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* **281**, 149-154.
- Unruh A., Ressel A., Mohamed H. G., Johnson R. S., Nadrowitz R., Richter E., Katschinski D. M. y Wenger R. H. (2003) The hypoxia-inducible factor-1 α is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* **22**, 3213-3220.
- ## V
- van Calker D., Muller M. y Hamprecht B. (1979) Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* **33**, 999-1005.
- Van Wylen D. G., Park T. S., Rubio R. y Berne R. M. (1986) Increases in cerebral interstitial fluid adenosine concentration during hypoxia, local potassium infusion, and ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **6**, 522-528.
- Vendite D., Sanz J. M., López-Alañón D. M., Vacas J., Andrés A. y Ros M. (1998) Desensitization of adenosine A1 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in cerebellar granule cells. *Neurochem Res* **23**, 211-218.
- Vernon A. C., Palmer S., Datla K. P., Zbarsky V., Croucher M. J. y Dexter D. T. (2005) Neuroprotective effects of metabotropic glutamate receptor ligands in a 6-hydroxydopamine rodent model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* **22**, 1799-1806.
- Vernon A. C., Zbarsky V., Datla K. P., Croucher M. J. y Dexter D. T. (2007) Subtype selective antagonism of substantia nigra pars compacta Group I metabotropic glutamate receptors protects the nigrostriatal system against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo. *J Neurochem* **103**, 1075-1091.

Villmann C. y Becker C. M. (2007) On the hypes and falls in neuroprotection: targeting the NMDA receptor. *Neuroscientist* **13**, 594-615.

W

Walker B. A., Rocchini C., Boone R. H., Ip S. y Jacobson M. A. (1997) Adenosine A2a receptor activation delays apoptosis in human neutrophils. *J Immunol* **158**, 2926-2931.

Walton M. R. y Dragunow I. (2000) Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci* **23**, 48-53.

Wang G. L., Jiang B. H., Rue E. A. y Semenza G. L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5510-5514.

Wang J. Q., Fibuch E. E. y Mao L. (2007) Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem* **100**, 1-11.

Wang R., Li Y. B., Li Y. H., Xu Y., Wu H. L. y Li X. J. (2008) Curcumin protects against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons by increasing brain-derived neurotrophic factor level and activating TrkB. *Brain Res* **1210**, 84-91.

Wang Z. F. y Tang X. C. (2007) Huperzine A protects C6 rat glioma cells against oxygen-glucose deprivation-induced injury. *FEBS Lett* **581**, 596-602.

Webb B. L., Hirst S. J. y Gienbycz M. A. (2000) Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. *Br J Pharmacol* **130**, 1433-1452.

Weinmann M., Jendrossek V., Handrick R., Guner D., Goecke B. y Belka C. (2004) Molecular ordering of hypoxia-induced apoptosis: critical involvement of the mitochondrial death pathway in a FADD/caspase-8 independent manner. *Oncogene* **23**, 3757-3769.

Wellington C. L. y Hayden M. R. (2000) Caspases and neurodegeneration: on the cutting edge of new therapeutic approaches. *Clin Genet* **57**, 1-10.

Wendler C. C., Amatya S., McClaskey C., Ghatpande S., Fredholm B. B. y Rivkees S. A. (2007) A1 adenosine receptors play an essential role in protecting the embryo against hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9697-9702.

Whittemore E. R., Loo D. T., Watt J. A. y Cotman C. W. (1995) A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience* **67**, 921-932.

Whitworth C. A., Ramkumar V., Jones B., Tsukasaki N. y Rybak L. P. (2004) Protection against cisplatin ototoxicity by adenosine agonists. *Biochem Pharmacol* **67**, 1801-1807.

Willets J. M., Parent J. L., Benovic J. L. y Kelly E. (1999) Selective reduction in A2 adenosine receptor desensitization following antisense-induced suppression of G protein-coupled receptor kinase 2 expression. *J Neurochem* **73**, 1781-1789.

Williams R. J., Spencer J. P., Goni F. M. y Rice-Evans C. A. (2004) Zinc-histidine complex protects cultured cortical neurons against oxidative stress-induced damage. *Neurosci Lett* **371**, 106-110.

Wollmer M. A., Lucius R., Wilms H., Held-Feindt J., Sievers J. y Mentlein R. (2001) ATP and adenosine induce ramification of microglia in vitro. *J Neuroimmunol* **115**, 19-27.

Wu Q., Combs C., Cannady S. B., Geldmacher D. S. y Herrup K. (2000) Beta-amyloid activated microglia induce cell cycling and cell death in cultured cortical neurons. *Neurobiol Aging* **21**, 797-806.

X

Xia Z., Choi E. J., Wang F., Blazynski C. y Storm D. R. (1993) Type I calmodulin-sensitive adenylyl cyclase is neural specific. *J Neurochem* **60**, 305-311.

Xu W., Wong T. P., Chery N., Gaertner T., Wang Y. T. y Baudry M. (2007a) Calpain-mediated mGluR1alpha truncation: a key step in excitotoxicity. *Neuron* **53**, 399-412.

Xu Y., Cui C., Pang C., Christen Y. y Luo Y. (2007b) Restoration of impaired phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) by EGb 761 and its constituents in Abeta-expressing neuroblastoma cells. *Eur J Neurosci* **26**, 2931-2939.

Xu Y., Ravid K. y Smith B. D. (2008) Major histocompatibility class II transactivator expression in smooth muscle cells from A2b adenosine receptor knock-out mice: cross-talk between the adenosine and interferon-gamma signaling. *J Biol Chem* **283**, 14213-14220.

Y

Yamamoto-Sasaki M., Ozawa H., Saito T., Rosler M. y Riederer P. (1999) Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type. *Brain Res* **824**, 300-303.

Yamauchi J., Nagao M., Kaziro Y. y Itoh H. (1997) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of Gbetagamma and Galphaq/11 subunits. *J Biol Chem* **272**, 27771-27777.

Yan K., Greene E., Belga F. y Rasenick M. M. (1996) Synaptic membrane G proteins are complexed with tubulin in situ. *J Neurochem* **66**, 1489-1495.

Yang D., Zhang Y., Nguyen H. G., Koupenova M., Chauhan A. K., Makitalo M., Jones M. R., St Hilaire C., Seldin D. C., Toselli P., Lamperti E., Schreiber B. M., Gavras H., Wagner D. D. y Ravid K. (2006) The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. *J Clin Invest* **116**, 1913-1923.

Yang J. N., Chen J. F. y Fredholm B. B. (2009) Physiological roles of A1 and A2A adenosine receptors in regulating heart rate, temperature and locomotion as revealed using knock-out mice and caffeine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.

Yang Y., Kinney G. A., Spain W. J., Breitner J. C. y Cook D. G. (2004) Presenilin-1 and intracellular calcium stores regulate neuronal glutamate uptake. *J Neurochem* **88**, 1361-1372.

Yankner B. A., Duffy L. K. y Kirschner D. A. (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* **250**, 279-282.

Yao H. H., Ding J. H., Zhou F., Wang F., Hu L. F., Sun T. y Hu G. (2005) Enhancement of glutamate uptake mediates the neuroprotection exerted by activating group II or III metabotropic glutamate receptors on astrocytes. *J Neurochem* **92**, 948-961.

Yasuda E., Nagasawa K., Nishida K. y Fujimoto S. (2008) Decreased expression of phospholipase C-beta 1 protein in endoplasmic reticulum stress-loaded neurons. *Biol Pharm Bull* **31**, 719-721.

Yoshioka K., Hosoda R., Kuroda Y. y Nakata H. (2002) Hetero-oligomerization of adenosine A1 receptors with P2Y1 receptors in rat brains. *FEBS Lett* **531**, 299-303.

Yu B. P. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**, 139-162.

Yu Y., Wang J. R., Sun P. H., Guo Y., Zhang Z. J., Jin G. Z. y Zhen X. (2008) Neuroprotective effects of atypical D1 receptor agonist SKF83959 are mediated via D1 receptor-dependent inhibition of glycogen synthase kinase-3 beta and a receptor-independent anti-oxidative action. *J Neurochem* **104**, 946-956.

Yuan J., Lipinski M. y Degtrev A. (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron* **40**, 401-413.

Z

- Zhao L., Qian Z. M., Zhang C., Wing H. Y., Du F. y Ya K. (2008) Amyloid beta-peptide 31-35-induced neuronal apoptosis is mediated by caspase-dependent pathways via cAMP-dependent protein kinase A activation. *Aging Cell* **7**, 47-57.
- Zhao X. H. y Nomura Y. (1990) Age-related changes in uptake and release on L-[3H]noradrenaline in brain slices of senescence accelerated mouse. *Int J Dev Neurosci* **8**, 267-272.
- Zhao Z., Makaritsis K., Francis C. E., Gavras H. y Ravid K. (2000) A role for the A3 adenosine receptor in determining tissue levels of cAMP and blood pressure: studies in knock-out mice. *Biochim Biophys Acta* **1500**, 280-290.
- Zhou Q. Y., Li C., Olah M. E., Johnson R. A., Stiles G. L. y Civelli O. (1992) Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7432-7436.
- Zhu P., DeCoster M. A. y Bazan N. G. (2004) Interplay among platelet-activating factor, oxidative stress, and group I metabotropic glutamate receptors modulates neuronal survival. *J Neurosci Res* **77**, 525-531.
- Zhu X., Lee H. G., Perry G. y Smith M. A. (2007) Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 494-502.
- Zieminska E., Stafiej A. y Lazarewicz J. W. (2003) Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones. *Neurochem Int* **43**, 481-492.

NOTA *del* AUTOR

Para los curiosos: sí, estos son los agradecimientos.

Lo primero es lo primero, una disculpa para todos aquellos a los que me dejo en el tintero, ahora convertido en teclado. Estaría bueno que cupiera toda la gente que me he ayudado a lo largo de estos cuatro últimos años de camino en un par de folios, no obstante, si no aparecéis en estos agradecimientos y creéis que debíais estar, la culpa es sólo mía, de mi mala memoria o de mi ingratitud, aunque yo se la atribuiré a algún error informático, que por lo visto están de moda últimamente. Además, pido disculpas a los que sí aparecen pero por causa de mi torpeza empleando la lengua de Cervantes no he sabido plasmar en palabras mis sentimientos, es que se me ha quedado metido en la cabeza lo de que *“el glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC”* y ya no me sale otra cosa.

Una vez dicho esto, un agradecimiento especial a los padres de la criatura, la científica me refiero, los otros vendrán más adelante. Mairena y José Luis os habéis portado estupendamente conmigo y ha sido para mí un auténtico placer haber estado viniendo a trabajar durante estos cuatro años al laboratorio. Realmente me habéis facilitado bastante las cosas haciéndome sentir muy cómodo en un negocio en el que, por desgracia, que tus jefes te traten como a un colega es más raro que acertar una quiniela con 15. Además del trato personal, quisiera agradecerlos la confianza que mostrasteis en mi cuando nos embarcamos en esta aventura científica sin conocernos de nada. Dentro de este agradecimiento quisiera incluir a Félix Jalón, que nos puso en contacto permitiéndome volver a Ciudad Real.

A mis compañeros de laboratorio, ¡menuda suerte he tenido con vosotros! A todos en general os agradezco la paciencia que tenéis conmigo, porque aguantarme así tan de seguido, fácil, lo que es fácil, no tiene que ser, no. A los veteranos David, M^a Ángeles y Macu, gracias por enseñarme esos pequeños trucos sin los que la ciencia no tendría sentido, principalmente porque no saldría ningún experimento, y, sobre todo, gracias por vuestra amistad y apoyo. A los nuevos Inma, Antonio, Dávide, Goffredo, Mar y Candelas, gracias por vuestra compañía tanto en los momentos buenos como en los malos porque trabajar en el laboratorio no está reñido con pasárselo bien en el laboratorio. A Sergio y a su paciencia infinita para aguantarnos a todos nosotros, tú sí que tienes el cielo ganado amigo. Una mención especial en este apartado merecen M^a Ángeles, que me ha enseñado todo lo que sé acerca de la obtención de cultivos primarios, e Inma, que me ha enseñado el lado oscuro de la fuerza en lo que a cuestiones de microscopía se refiere, no sé si me explico. Independientemente de lo que haya podido aprender de cada uno de vosotros me siento muy afortunado de haberos conocido y haber podido compartir una etapa importante de mi vida con vosotros, la fuerza siempre estará con vosotros (dios, qué ganas tenía de escribirlo).

También quiero mencionar a todas las personas que han pasado por el laboratorio estos años, independientemente del grupo en el que hayan trabajado, porque la verdad sea dicha, no sé qué tendrá este laboratorio que atrae a la buena gente. A Charo y a Raúl *Tamarillas* os agradezco especialmente vuestra amistad y la oportunidad que me brindasteis de cambiar el mundo de la ciencia por el mundo del toreo (en qué

estaría yo pensando para no aprovecharla...) y os deseo lo mejor siempre. A Agnes, Aurora, Alejandro y Cristina os agradezco los buenos momentos compartidos y lo buenos compañeros que habéis sido conmigo. Dentro de este apartado quisiera añadir al dúo Gomaespuma, que me ha acompañado en la realización de unos cuantos cultivos primarios aunque, según creo, ellos ni se lo imaginaban, y a Forges, que me ha prestado su ingenio para la “contraportada alternativa” y siempre que puede nos echa una mano a los becarios. Por último, un agradecimiento especial a toda la gente no relacionada directamente con el laboratorio que hace que las cosas funcionen como es debido, sobre todo para Teresa, María y Mamen, personas excelentes a quienes además aprecio enormemente.

A mis compañeros de carrera química Amparo, M^a Jesús, Bea, Puri, Isabel, José Ramón y Marisa quisiera agradecer los buenos momentos compartidos y el poder seguir contando con vuestra amistad. A Antonio Manuel y Abel no tengo palabras para agradecer lo bien que me lo hacíais pasar en la biblioteca, con amigos como vosotros ya podrían durar las carreras 15 años que no se iban a hacer largas. Por cierto Antonio ahí queda eso: “Casco porro”, la pelota está ahora en tu tejado, tú ya me entiendes. De mi aventura madrileña merece toda mi gratitud Paula las Heras, o de las Heras, o cómo sea, tú me ayudaste en momentos donde sólo había oscuridad a mi alrededor y a tu constante apoyo le debo hoy ser licenciado en Bioquímica, realmente no te mereces más que lo mejor.

Además de una placa honorífica en la Universidad, por todo el dinero que se han gastado en matrículas, se merecen una mención especial mis amigos Tomás, Toni, Pedro, José Antonio, Helena y Rubén, vosotros le dais sentido a la palabra amistad tal y como yo la entiendo, aunque estéis un poco obsesionados con la idea de tener que cerrar todos los bares a los que vamos (que conste que Helena no entra en el comentario de las matrículas, ahora, en lo de los bares que nadie piense que se queda atrás). A Tomás, que nos conocimos por cuestiones alfabéticas pero a quien yo considero parte de mi propia familia, le agradezco especialmente esta amistad y su apoyo incondicional en momentos muy difíciles para mi, aunque creo que la amistad no se puede agradecer, pero tampoco me voy a poner a filosofar aquí, espero que si tú me necesitas algún día pueda estar a tu altura.

Cómo no agradecer a las personas que convivieron conmigo el primer año que me marché de casa Pedro, Rober, Chorr y Feli y empezaron a hacer de Ciudad Real, más que el sitio donde pasaba la semana estudiando, mi segundo hogar. También a mi compañero de piso en Madrid, Baldomero, le debo haber conservado mi cordura totalmente intacta.

De entre todos los profesores que me han ido enseñando a lo largo de estos años (cuidado, hay otros de los que es mejor ni hablar) quisiera destacar la labor de algunos de ellos que recuerdo con especial cariño como son D. José Luis Malagón, que me tenía mucho cariño, y Dña. Puri, que también me lo tenía pero no lo demostraba, aunque ahora sí lo hace. A Carmen Garrote y a David Arona les agradezco que me enseñaran que ser bueno no es suficiente, lo difícil es alcanzar la perfección, no penséis que se me ha olvidado, es un precepto que me aplico a diario. A Pilar Prieto le tengo que agradecer el amor que transmite por la química, a veces tan

árida y desagradecida, además de que eres una profesora como la copa de un pino, desde luego la mejor que yo he tenido en la Facultad, eres mejor persona todavía y ha sido para mí un placer ser tu alumno.

Le he estado dando algunas vueltas al hecho de desquitarme aquí con algunas personas, los que me conocen ya saben lo aficionado que soy a las listas negras y todo el rollo ese. El caso es que, llegados a este punto, no sé si es que me estoy volviendo blando con la edad, me parece que también debería en cierto modo, desde luego agradecer no, pero sí mencionar a aquellas personas que alguna vez me han clavado un puñal por la espalda, entre el cuarto y el quinto espacio intercostal, porque han hecho de mí una persona más fuerte y me han obligado a sobreponerme a la adversidad. ¿Qué tal Alberto? Pues nada, aquí sangrando, como me acabas de acuchillar y eso. Sólo hay una excepción a esta afirmación, llamémosle *I*, contigo sí que no paso página amigo, es más, me reservo el derecho de escribir en un futuro una novela negra y ahí te vas a enterar de lo que es bueno.

Sólo me queda agradecer a mi familia todo el cariño y el apoyo que me han dado (por fin escribo *apoyo* sin que salte el corrector ortográfico), aunque se trate de una mención colectiva quisiera mencionar de forma específica a algunas personas. Muy especialmente a mis padres, a Polo, que me enseñó a hacer las cosas con ternura pero con... (lo de *con ternura* no me lo enseñaste tú, pero no te preocupes que la segunda parte la sigo a rajatabla), y a la Lola, que si me hubiera o hubiese hecho yonqui de profesión no me habría dado un gramo menos de cariño. A vosotros dos os debo todo lo que soy y difícilmente os lo puedo agradecer con palabras, esto es sólo un mal intento. A mi hermana María, a quien quiero mucho más de lo que sé demostrarle aunque me gustaría saber hacerlo, le deseo todo lo mejor, yo estoy convencido de que puedes conseguir todo lo que quieras, pero te tienes que dar cuenta tú, hasta que lo hagas (que parece que va a llevar un tiempo) me tienes para lo que quieras. A mis abuelos Numancia, Juliana, Juan y Vicenta, que a estos sí que les tocó vivir en tiempos difíciles y todavía tuvieron tiempo y fuerza para formar sus propias familias y sacarlas adelante y, todo ello, sin renunciar a sus ideales lo que, los que vinimos detrás no sabemos agradecer lo suficiente. Me gustaría hacer este agradecimiento más patente en el caso de Juan y Vicenta, que me criaron como su cuarto hijo y así me siguieron tratando el resto de mi vida. Al resto, muchas gracias a todos.

Por último, sólo me queda agradecer el apoyo y ayuda de mi pequeña *familieja*. A Kimi, que me ha visto escribir este tocho casi sin parpadear, principalmente porque se tiraba el 90% del tiempo roncando como un oso, y me ha dado más cariño en su año de vida que muchos humanos en lo que llevo de la mía. Y a Gema, por tantas y tantas cosas que tendría que escribir otras 281 páginas más para poder agradecértelo todo, que no es por no escribirlas, que sabes que si hay que escribirlas se escriben, pero vendrían a decir que me hace muy feliz que compartas tu vida conmigo y me apoyes en todo, sobre todo en el rollo este de la Ciencia, que yo entiendo que para los ajenos al negocio estas pasiones son difíciles de entender.





FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
INORGÁNICA, ORGÁNICA
Y BIOQUÍMICA.